



HAL
open science

Mise en place d'une stratégie de validation fonctionnelle de variations de signification incertaine dans les pathologies constitutionnelles du globule rouge

Lamisse Mansour-Hendili

► To cite this version:

Lamisse Mansour-Hendili. Mise en place d'une stratégie de validation fonctionnelle de variations de signification incertaine dans les pathologies constitutionnelles du globule rouge. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2022. Français. NNT : 2022PA120057 . tel-04329914

HAL Id: tel-04329914

<https://theses.hal.science/tel-04329914>

Submitted on 7 Dec 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-EST

ÉCOLE DOCTORALE SVS Sciences de la vie et de la santé

Laboratoire : Transfusion et Maladies du Globule rouge (INSERM U955 – IMRB – EFS)

Thèse de doctorat

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Lamisse MANSOUR-HENDILI

Mise en place d'une stratégie de validation fonctionnelle de variations de signification incertaine dans les pathologies constitutionnelles du globule rouge

Thèse dirigée par le Pr Frédéric GALACTÉROS et le Pr Benoît FUNALOT

Soutenue le 23 Juin 2022

Jury :

Pr Patricia AGUILAR-MARTINEZ	Rapporteur
Pr Betty GARDIE	Rapporteur
Pr France PIRENNE	Examineur
Dr Stéphane ÉGÉE	Examineur
Pr Carlo BRUGNARA	Examineur

Travaux réalisés au sein de :

L'INSTITUT MONDOR DE RECHERCHE BIOMÉDICALE

Laboratoire : Transfusion et maladies du globule rouge (Equipe 2)

Dirigé par le Pr France PIRENNE

UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL

INSERM U955

ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG

Centre Félix REYES – 2^{ème} étage

5, rue Gustave Eiffel

94000 CRÉTEIL

Mise en place d'une stratégie de validation fonctionnelle de variations de signification incertaine dans les pathologies constitutionnelles du globule rouge

Mots-clés : séquençage haut débit, variations, fonctionnel, classification, réseau collaboratif, globule rouge, hémolyse

Résumé

Le déploiement du séquençage haut débit (SHD) ces dix dernières années au sein des laboratoires de génétique hospitaliers en France et dans le monde a révolutionné la prise en charge des maladies rares dont les anémies hémolytiques constitutionnelles (AHC). Il a conduit à la découverte de multiples variations de signification incertaine (VSI) nécessitant la mise en œuvre de tests fonctionnels pour aboutir à une classification fonctionnelle. L'objectif de ce travail est de proposer une stratégie réaliste et efficace d'exploration fonctionnelle de VSI associés aux AHC. Cette démarche repose sur les études génétiques familiales, l'étude de transcrits sur tubes Paxgene, le développement de méthodes d'études sur site comme le LORRCA MaxSis pour l'étude de la membrane du GR, la réorientation de techniques comme la courbe de densité des GR par gradient de phtalates et la mise en place d'un réseau collaboratif (exemple du CNRS de Roscoff pour les études électrophysiologiques). Nous avons montré l'intérêt du SHD chez ces patients avec suspicion d'AHC et avons mis en évidence des associations de variations d'intérêt dans différents gènes de pathologies du GR chez un même patient (Mansour-Hendili et al 2020). Nous avons identifié une nouvelle entité pathologique chez deux patients avec une anémie hémolytique « auto-immune à test direct à l'antiglobuline négatif » non répondeurs aux immunomodulateurs. Il s'agit d'un mécanisme de sphérocytose acquise par mutation ponctuelle du gène *ANK1* probablement associé à une hématopoïèse clonale du sujet âgé (Mansour-Hendili et al., n.d.). La réalisation d'un génome entier a permis d'aboutir à un diagnostic pour un enfant atteint d'une hémolyse inexplicée transfuso-dépendante avec retard neurodéveloppemental due au gène *VPS4A* (Lunati-Rozie et al 2021). Via un système de reconvoation de patients, les explorations complémentaires ont pu être réalisées. Vingt-trois patients ont eu une étude de transcrits permettant la reclassification de seize variations. Dix études familiales ont été réalisées dont une excluant le caractère délétère d'un VSI du gène *GATA1*. Nous avons montré l'intérêt de la mesure de la densité des GR comme outil de screening des pathologies de membrane du GR. Son utilisation comme test fonctionnel dans les cas d'associations de variations dans des gènes de membrane a mis en exergue l'utilité du taux de cellules denses comme marqueur différentiel de la présence/absence de la variation associée. Concernant le LORRCA, les profils d'osmoscan permettent de discriminer des profils de patients avec associations de variations comparativement à des témoins « positifs » sans association. Les études de stabilité menées pour ces tests phénotypiques à différents temps et températures de stockage montrent l'importance des conditions pré-analytiques. Nous avons illustré ce problème avec la mutation connue du gène *KCNN4* : p.R352H décrite avec des profils d'osmoscan et d'ektacytométrie normaux. Nous avons

retrouvé à deux reprises sur deux échantillons et manipulations indépendantes réalisées à J0 sans stockage des profils d'osmoscan anormaux. Par ailleurs, nous montrons l'intérêt de l'étude des propriétés électrophysiologiques des canaux PIEZO1 et KCNN4 réalisée à Roscoff dans la classification de VSI (Mansour-Hendili et al 2021). Pour les cas d'associations de variations d'intérêt les profils d'interprétation sont plus complexes mais montrent également des différences de profil par rapport à des témoins bien choisis. Ce travail a permis de démontrer l'utilité en plus des études familiales et de transcrits, d'outils diagnostic ou de suivi phénotypiques du GR (LORRCA, densité des GR) pour l'aide à la validation fonctionnelle de VSI isolés ou en association dans les AHC. Cela nécessite des moyens de reconvoction, des contrôles positifs adéquats (cas intrafamiliaux) et un respect des conditions préanalytiques. La mise en place de réseaux collaboratifs apporte de plus une véritable utilité et une plus-value intellectuelle et humaine réciproque. Le retour au phénotype est un recours indispensable à la classification des VSI notamment pour les AHC.

Strategy for functional validation of variants of uncertain significance in red blood cell diseases

Key words : next generation sequencing, variations, functional, classification, collaborative network, red blood cell, hemolysis

Summary

The deployment of next generation sequencing (NGS) over the past ten years in hospital genetic laboratories in France and around the world has revolutionized the management of rare diseases, including constitutional hemolytic anemia (CHA). It has led to the multiplication of variations of uncertain significance (VUS) requiring the implementation of functional tests to permit a re-classification. The objective of this work is to propose a realistic and effective strategy for the functional exploration of VUS associated with CHA. This approach is based on family genetic studies, study of transcripts on Paxgene tubes, development of methods on-site such as the LORRCA MaxSis for the study of the RBC membrane properties, improvement of techniques such as the RBC density measurement by phthalate gradient and establishment of a collaborative network (example of CNRS in Roscoff for electrophysiological studies). We have shown the interest of NGS in these patients with suspected CHA and have highlighted associations of variations of interest in different genes of RBC pathologies in the same patient (Mansour-Hendili et al 2020). We identified a new pathological entity in two patients with “autoimmune direct antiglobulin test negative” haemolytic anemia who did not respond to immunomodulators. This is a mechanism of acquired spherocytosis by point mutation of the *ANK1* gene probably due to clonal hematopoiesis in the elderly (Mansour-Hendili et al., n.d.). The realization of a whole genome sequencing led to a diagnosis for a child suffering from unexplained transfusion-dependent hemolysis with neurodevelopmental delay due to the *VPS4A* gene (Lunati-Rozie et al 2021). Via a patient recall system, additional explorations have been carried out. Twenty-three patients underwent a transcript study allowing the reclassification of sixteen variations. Ten family studies have been carried out, one of which excludes the deleterious nature of a VUS of the *GATA1* gene. We have shown the interest of measuring RBC density as screening tool for RBC membrane diseases. Its use as a functional test in the case of associations of variations in RBC membrane genes has highlighted the usefulness of the dense cell rate as a differential marker of the presence/absence of the associated variation. Concerning the LORRCA, osmoscan profiles make it possible to discriminate patient with associations of variations compared to “positive” controls without association. Stability studies conducted for these phenotypic tests at different storage times and temperatures show the importance of pre-analytical conditions. We illustrated this problem with the known *KCNN4* gene mutation: p.R352H described with a normal osmoscan and ektacytometry profiles. We found twice on two independent samples and manipulations realized on DO without storage abnormal osmoscan profiles. In addition, we show the interest of the study of electrophysiological properties of the *PIEZO1* and *KCNN4* channels carried out in Roscoff in the classification of VUS (Mansour-Hendili et al 2021). For the associations of variations

of interest, the interpretation profiles are more complex but also show profiles differences compared to well-chosen controls. This work has made it possible to demonstrate the usefulness, in addition to family and transcript studies, of RBC phenotypic diagnostic or monitoring tools (LORRCA, density of the GR) to help with the functional validation of isolated or associated VUS in CHA patients. This requires means of revocation, adequate positive controls (intrafamilial cases) and compliance with preanalytical conditions. The establishment of collaborative networks also brings real usefulness and reciprocal intellectual and human added value. The return to the phenotype is an essential recourse for the classification of VUS in particular for the CHA.

Table des matières

1	Objectifs	20
2	Etat de l'art	20
2.1	Le globule rouge	20
2.1.1	Sa naissance	20
2.1.2	Sa structure, ses propriétés	22
2.1.2.1	La structure du GR	22
2.1.2.1.1	La membrane du GR	22
2.1.2.1.1.1	La bicouche phospholipidique	22
2.1.2.1.1.2	Le cytosquelette membranaire	23
2.1.2.1.2	Les principaux canaux d'intérêt	25
2.1.2.1.2.1	Le canal PIEZO1	26
2.1.2.1.2.2	Le canal Gardos	28
2.1.2.2	Les principales propriétés du GR	29
2.1.2.2.1	La déformabilité	29
2.1.2.2.2	La densité des GR	30
2.1.3	Ses principales fonctions, sa raison d'être	30
2.1.4	Sa mort, l'hémolyse quelques notions clés	33
2.2	Les anémies hémolytiques	38
2.2.1	Les formes constitutionnelles	38
2.2.1.1	Les pathologies de membrane du GR	40
2.2.1.1.1	La sphérocytose héréditaire (SH)	42
2.2.1.1.2	Les elliptocytoses héréditaires	42
2.2.1.1.3	L'ovalocytose du sud est asiatique (SAO)	43
2.2.1.1.4	Les pathologies de membrane du GR dues à un défaut d'hydratation	43
2.2.1.1.4.1	La stomatocytose héréditaire déshydratée	44
2.2.1.1.4.2	La stomatocytose héréditaire hyperhydratée	44
2.2.1.1.4.3	La cryohydrocytose et la pseudo-hyperkaliémie familiale	44
2.2.1.2	La prise en charge diagnostique des AHC et la place du SHD	45
2.2.1.3	Focus sur les formes syndromiques d'AHC	48

2.2.1.4	Associations de plusieurs causes d’AHC ou d’AHC à d’autres pathologies génétiques	49
2.2.2	Les formes acquises d’anémie hémolytique	49
2.2.2.1	Dans le cadre des syndromes myélodysplasiques ou myéloprolifératifs	50
2.2.2.2	Dans le cadre des MAT, HPN et AHAI	50
2.2.2.2.1	Les microangiopathies thrombotiques	50
2.2.2.2.2	L’hémoglobinurie paroxystique nocturne ou HPN	51
2.2.2.2.3	L’anémie hémolytique auto-immune ou AHAI.....	51
2.3	Le séquençage haut débit	51
2.3.1	Une brève présentation.....	51
2.3.2	Les variations de signification incertaine VSI ou VUS (variant of uncertain significance).....	54
2.3.3	Les outils d’interprétation des VSI	57
3	Matériel et Méthodes	63
3.1	Objectifs et Stratégie proposés	63
3.2	Patients.....	64
3.3	Extraction ADN.....	64
3.4	Séquençage haut débit et analyse bioinformatique.....	65
3.5	LORRCA.....	65
3.6	Courbe de densité des GR par gradient de phtalates.....	67
3.7	Etude ARN.....	68
3.8	Démarche collaborative	68
3.8.1	Carte des collaborations	68
3.8.2	FOCUS sur la collaboration avec le CNRS de Roscoff	69
3.8.2.1	Mesure du contenu en eau	69
3.8.2.2	Analyse morphologique des cellules.	69
3.8.2.3	Mesure de variation de potentiel.....	69
4	Résultats.....	72
4.1	Résultats du SHD.....	72
4.1.1	Article 1 OJRD 2020.....	72

4.1.1.1	Présentation	72
4.1.1.2	Focus sur les études familiales issues de la figure 2 de l'article 1.....	88
4.1.1.3	Conclusions et discussion article 1	89
4.1.2	Article 2 : Sphérocytose acquise par mutations ponctuelles <i>ANK1</i>	91
4.1.2.1	Présentation	91
4.1.2.2	Conclusions et discussion de l'article 2.....	100
4.1.3	Article 3 : Résolution d'un cas syndromique d'AHC via séquençage très haut débit	101
4.1.3.1	Présentation	101
4.1.3.2	Résultat et discussion article 3	105
4.2	Résultats des études ARN.....	106
4.2.1	Tableau de résultats	106
4.3	Etudes familiales	108
4.3.1	Famille <i>GATA1</i>	108
4.3.1.1	Description du cas.....	108
4.3.1.2	Résultat génétique.....	109
4.4	Description clinico-biologique et génétique des patients d'intérêt	109
4.5	Etude de la densité des GR en gradient de phtalates.....	115
4.5.1	Etude de stabilité	115
4.5.2	Profils selon pathologies.....	118
4.5.2.1	Interprétation des courbes de densité du GR pour les cas des associations de variants 119	
4.5.2.1.1	Patient 1	119
4.5.2.1.2	Patient 2	120
4.5.2.1.3	Patient 3	121
4.6	Résultats LORRCA osmoscan	121
4.6.1	Point d'intérêt majeur : importance du préanalytique.....	121
4.6.1.1	Test de stabilité	121
4.6.1.1.1	Patients GARDOS	121
4.6.1.1.2	Patient 4 DHSt PIEZO1.....	123

4.6.2	Cas des pathologies simplex	124
4.6.2.1	Exemple de la mutation p.R352H de <i>KCNN4</i>	124
4.6.3	Cas des associations de variants : profils osmoscan	126
4.6.3.1	Patient 1 et 1'	126
4.6.3.2	Patient 2	126
4.6.3.3	Patient 3	127
4.6.4	Résultats étude fonctionnelle d'électrophysiologie réalisée à Roscoff	128
4.6.4.1	Cas dits simplex	129
4.6.4.1.1	Patient 4 DHSt PIEZO1.....	129
4.6.4.1.2	Patient 5 : Article 4	131
4.6.4.1.2.1	Présentation.....	131
4.6.4.1.2.2	Résultats et discussion article 4	136
4.6.4.2	Cas des associations de variants	136
4.6.4.2.1	Patients 1 et 1'	136
4.6.4.2.2	Patient 2	140
4.6.4.2.3	Patient 3	142
4.7	Tableau récapitulatif des résultats des associations	143
5	Conclusions.....	144
5.1	SHD et AHC	144
5.2	Etudes ARN	144
5.3	Etudes familiales	145
5.4	Densité des GR.....	145
5.5	LORRCA.....	145
5.6	ROSCOFF.....	146
6	Discussion générale et perspectives.....	147
7	ANNEXES	151
7.1	Annexe 1 - Liste gènes panel membrane et CDA	151
7.2	Annexe 2- Liste gènes panel AHC v1	151
7.3	Annexe 3 - Matériel et méthodes Génome Seqoia	153
7.4	Annexe 4 - Conditions des réactions ARN.....	154

7.5	Annexe 5 - Descriptif des réactifs techniques ROSCOFF.....	157
7.6	Annexe 6 - Profils courbe de densité des GR selon les pathologies.....	158
7.7	Annexe 7 - Profils LORRCA différents patients selon pathologie	160
8	References.....	166

Table des illustrations

Figure 1 : Erythropoïèse humaine et expression des hémoglobines	21
Figure 2 : Erythropoïèse chez l'adulte dans la moëlle osseuse.	22
Figure 3 : Structure de la membrane d'un GR « jeune » avant 120 jours	23
Figure 4 : Schéma de la membrane du globule rouge.....	24
Figure 5 : Microscopie électronique du cytosquelette membranaire du GR avec visualisation des réseaux de spectrine	25
Figure 6 : Principaux canaux de la membrane du GR régulant les flux ioniques.....	26
Figure 7 : Vue schématique des différents tissus de l'organisme humain exprimant PIEZO1 et ses rôles spécifiques	27
Figure 8 : Structure de PIEZO1	28
Figure 9 : Structure du canal Gardos ou Kca3.1.....	29
Figure 10 : Observation de la microcirculation capillaire par capillaroscopie diamètre de 3 à 8 µm	30
Figure 11 : Schéma des échanges gazeux au niveau du système capillaire	31
Figure 12 : Structure de l'hémoglobine et de l'hème.	32
Figure 13 : Courbe de dissociation de l'Hb en fonction de la PO ₂	33
Figure 14 : Principales voies de la glycolyse dans le GR	34
Figure 15 : Schéma simplifié de l'hémolyse extravasculaire physiologique.....	36
Figure 16 : Dégradation de l'hème.....	36
Figure 17 : Schéma du processus d'hémolyse.	37
Figure 18 : Passage des GR par la rate.....	38
Figure 19 : Principales causes d'AHC et en italique les principaux gènes connus aujourd'hui en diagnostic dans ces pathologies dans les formes non syndromiques	40
Figure 20 : Représentation schématique des principales protéines de la membrane du GR	41
Figure 21 : Formes pathologiques de globules rouges pouvant être retrouvées dans certaines pathologies du GR	42
Figure 22 : Gènes impliqués dans les principales pathologies de membrane du GR et leurs modes de transmission	45
Figure 23 : Arbre diagnostique issu des recommandations de (King et al., 2015), principalement basé sur les tests phénotypiques	46
Figure 24 : Proposition d'arbre diagnostique Zaninoni et al 2018	46
Figure 25 : Algorithme de prise en charge diagnostique des AHC (Kalfa, 2021)	47
Figure 26 : Comparaison Sanger/SHD	52
Figure 27 : Différentes plateformes de séquençage haut débit	53
Figure 28 : Frise chronologique du séquençage	53

Figure 29 : « Workflow » simplifié du SHD avec les principales étapes et les applications autres que celles ADN	54
Figure 30 : Critères de classification ACMG	55
Figure 31 : Classification revue de l'ACMG : Sherlock.....	56
Figure 32 : Place des VSI dans la base de données Clinvar.....	57
Figure 33 : Exemples d'outils de prédiction bioinformatique	58
Figure 34 : Etapes nécessaires pour produire, valider et utiliser les données d'une MAVE	60
Figure 35 : Stratégie d'examens complémentaires.....	64
Figure 36 : Schéma du « bob » et de la « cup » du LORRCA.....	66
Figure 37 : Courbe de déformabilité LORRCA.....	67
Figure 38 : Technique de mesure de la densité des GR en gradient de phtalates	68
Figure 39 : Collaborations	68
Figure 40 : Schéma des effets sur les flux ioniques des composés utilisés à Roscoff.....	71
Figure 41 : Arbres généalogiques de 3 familles avec sphérocytose héréditaire et 6 familles avec hémolyse inexpliquée.....	89
Figure 42 : Arbre généalogique famille <i>GATA1</i>	109
Figure 43: Profils de stabilité des courbes de densité des GR des patients avec SH	115
Figure 44 : Profils de stabilité des courbes de densité des GR de patients avec CDA = dysérythropoïèse congénitale.....	116
Figure 45 : Profils de stabilité des courbes de densité des GR dans le cas des stomatocytoses héréditaires déshydratées	116
Figure 46 : Pourcentage de cellules denses en fonction du temps et de la température de stockage chez des patients avec pathologies de membrane du GR et CDA	117
Figure 47 : Courbe de densité en gradient de phtalates du patient 4_DHSt_ <i>PIEZO1</i>	118
Figure 48 : Courbe de densité en gradient de phtalates du patient 5 avec un syndrome de Gardos	119
Figure 49 : Courbes de densité à J0 pour le patient 1 et 1' réalisées à trois temps différents ...	119
Figure 50 : Courbes de densité des GR pour des patients SS avec taux de cellules denses standard	120
Figure 51 : Courbe de densité des GR à distance d'une transfusion du Patient 2, patiente SS avec VSI <i>PIEZO1</i>	120
Figure 52 : Profils de patients avec beta thalassémies majeures/intermédiaires et le patient 3	121
Figure 53 : Profils osmoscan en LORRCA du patient 1	122
Figure 54 : Profils osmoscan en LORRCA du patient 1'	122
Figure 55 : Profils osmoscan en LORRCA du patient 4_DHSt_ <i>PIEZO1</i>	123
Figure 56 : Profils Osmoscan en LORRCA des patient 1 et patient 1' en 2018 et 2020	125
Figure 57 : Profils osmoscan en LORRCA du patient 2	127
Figure 58 : Profil osmoscan en LORRCA du patient 3 avant transfusion.....	128

Figure 59 : Contenu en eau mesuré pour le patient 4	129
Figure 60 : Résultat d'étude électrophysiologique avec A23187 pour le patient 4 DHSt <i>PIEZO1</i>	129
Figure 61 : Résultat d'étude électrophysiologique avec NS309 pour le patient 4 DHST <i>PIEZO1</i>	130
Figure 62 : Résultat d'étude électrophysiologique avec YODA1 pour le patient 4 DHST <i>PIEZO1</i>	130
Figure 63 : Surface projetée des GR des patients 1 et 1'	137
Figure 64 : Mesure du contenu en eau des GR du contrôle, des patients 1 et 1'	137
Figure 65 : Circularité des GR du contrôle, du patient 1 et du patient 1'	138
Figure 66 : Mesure des variations du potentiel de membrane du GR par la technique du CCCP avec ajout de 10 μ M de A23187 pour les patients 1 et 1'.....	138
Figure 67 : Mesure des variations du potentiel de membrane du GR par la technique du CCCP avec ajout de NS309 à 3 concentrations différentes chez le patient 1.....	139
Figure 68 : Mesure des variations du potentiel de membrane du GR par la technique du CCCP avec ajout de NS309 à 3 concentrations différentes chez le patient 1'.....	139
Figure 69 : Mesure du contenu en eau chez le patient 2 = SS + variant <i>PIEZO1</i> , chez un « contrôle » SS et chez un contrôle sain	140
Figure 70 : Aspect des plasmas à l'arrivée des tubes à Roscoff après centrifugation	140
Figure 71 : Mesure des variations du potentiel de membrane du GR par la technique du CCCP après ajout de A23187 pour le patient 2.....	141
Figure 72 : Mesure des variations du potentiel de membrane du GR par la technique CCCP après ajout de NS309 à 50 μ M	142
Figure 73 : « Workflow » de mise en place de collaboration	150

Liste des tableaux

Tableau 1: Normes osmoscan sur 17 témoins	66
Tableau 8 : Résultats étude de transcrits	107
Tableau 2 : Description du patient 1	109
Tableau 3 : Description du patient 2	110
Tableau 4 : Description du patient 3	110
Tableau 5 : Description du patient 4	111
Tableau 6 : Description du patient 5	111
Tableau 7 : Résultats biologiques des patients 1, 1', 2, 3 ,4 et 5 ; H = Hommes ; F = Femmes...	114
Tableau 9 : Pourcentage de cellules denses à J0, J1+4°C, J1 TA, J2+4°C, J2 TA chez différents patients avec des pathologies de membrane du GR et CDA (valeurs normales <1%).....	117
Tableau 10 : Paramètres osmoscan Patient 1 à J0, J1 +4°C, J2 +4°C et J1 TA.....	122
Tableau 11 : Paramètres osmoscan du patient 1' à J0, J1 +4°C, J2 +4°C, J1 TA et J2 TA.....	123
Tableau 12 : Paramètres osmoscan pour le patient 4 à J0, J1 +4°C, J2 +4°C, J1 TA et J2 TA	124
Tableau 13 : Données de la littérature concernant les profils en ektacytométrie ou LORRCA en osmoscan de patients avec la mutation p.R352H de <i>KCNN4</i>	125
Tableau 14 : Paramètres osmoscan des patient 1 et patient 1' réalisés en 2018 et 2020 et chez le patient 5.....	126
Tableau 15 : Paramètres osmoscan du patient 2 et valeurs normales des paramètres osmoscan obtenus chez 19 patients SS sans hydroxyurée	127
Tableau 16 : Tableau récapitulatif des résultats des explorations réalisées chez les patients avec des associations de variants	143

Liste des abréviations

2,3 BPG = 2,3 biphosphoglycérate

ACMG = american college of medical genetic

AD = autosomique dominant

ADN = acide désoxyribonucléique

ADN = acide désoxyribonucléique

ADNc = ADN complémentaire

AHAI = anémie hémolytique auto-immune

AHC = anémie hémolytique constitutionnelle

AJH = american journal of hematology

AR = autosomique récessif

ARN = acide ribonucléique

ATP = adenosine triphosphate

BFU-E = burst forming unit erythroid

CCCP = Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone

CCMH = concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

CCUS = Clonal cytopenia (s) of undetermined significance

CDA = congenital dyserythropoietic anemia

cDNA = complementary desoxyribonucleic acid

CFU-E = colony forming unit erythroid

CHIP = clonal hematopoiesis of indeterminate potential

CO₂ = dioxyde de carbone

CRP = C reactive protéine

CSH = cellules souches hématopoïétiques

DHSt = dehydrated hereditary stomatocytosis = stomatocytose héréditaire déshydratée

EDTA = Éthylènediaminetétraacétique

EMA = éosine maléimide

G6PD = glucose 6 phosphate déshydrogénase

GGT = gamma glutamyl transférase

GR = globule rouge

Hb = hémoglobine

HO = heme oxygenase

HPN = hémoglobinurie paroxystique nocturne

HUPRA = Hyperuricemia, Pulmonary hypertension, Renal failure in infancy and Alkalosis

ICUS = Idiopathic cytopenia of undetermined significance

IPS = induced pluripotent stem cells

LDH = lactate déshydrogénase

LORRCA = Laser-assisted Rotational Red Cell Analyser

MAT = microangiopathie thrombotique

MAVE = multiplexed assay of variants effect

MCGRE = maladies constitutionnelles du globule rouge et de l'érythropoïèse

mRNA = mature RNA

NAD = Nicotinamide adénine dinucléotide

NADP = Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NFS = numération de formule sanguine

NGS = next generation sequencing

NO = monoxyde d'azote

O₂ = dioxygène

OHSt = overhydrated hereditary stomatocytosis

PEM = progéniteur érythro-myéloïde

PFMG 2025 = plan France médecine génomique 2025

PMCA = plasma membrane calcium ATPase

PS = phosphatidylsérine
PTT = purpura thrombotique thrombocytopenique
PVP = polyvinylpyrrolidone
RCP = réunion de concertation pluridisciplinaire
RNA = ribonucleic acid
RT-Q-PCR = reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SAO = south east asia ovalocytosis
SBS = sequencing by synthesis
SDM = syndrome drépanocytaire majeur
SEA = south east asia
SH = sphérocytose héréditaire
SHD = séquençage haut débit
SHU = syndrome hémolytique et urémique
SHUa = syndrome hémolytique et urémique atypique
SMD = syndrome myélodysplasique
SMP = syndrome myéloprolifératif
SOD = superoxyde dismutase
STHD = séquençage très haut débit
TA = température ambiante
TDA = test direct à l'antiglobuline
TE = Thrombocytémie essentielle
VGM = volume globulaire moyen
VSI = variant de signification incertaine
VUS = variant of uncertain significance
WES = whole exome sequencing
WGS = whole genome sequencing

« Seuls se félicitent d'être arrivés ceux qui se savent incapables d'aller plus loin. »

Le premier siècle après Béatrice - Amin Maalouf

« La science n'est rien du tout. Elle ne sert à impressionner ceux qui n'y connaissent rien. Les vrais scientifiques savent qu'on ne sait rien et que plus on avance, plus on s'aperçoit de son ignorance. »

Le jour des fourmis - Bernard Werber

1 Objectifs

Ce travail s'inscrit dans la continuité de la routine diagnostique effectuée au laboratoire de génétique de l'Hôpital Henri Mondor concernant les anémies hémolytiques constitutionnelles (AHC). L'utilisation du Séquençage Haut Débit (SHD) a conduit à la découverte de multiples variations de signification incertaine (VSI) nécessitant une validation fonctionnelle. Nous proposons ici une démarche abordable permettant d'avancer vers une meilleure compréhension des VSI dans le monde des pathologies du globule rouge (GR). Nous n'avons pas détaillé l'ensemble des résultats découlant de cette pratique diagnostique car trop nombreux et variés. Nous avons décidé de focaliser notre propos et les résultats présentés sur quelques cas d'intérêt et certains de nos travaux déjà publiés. C'est pourquoi l'état de l'art n'est lui-même pas exhaustif ni « catalogue ». Nous avons choisi de développer certaines pathologies hémolytiques constitutionnelles qui sont principalement celles concernées par les résultats présentés. Ce focus s'est donc fait sur les maladies de membrane du globule rouge les plus fréquentes comme la sphérocytose héréditaire et également sur les stomatocytoses héréditaires déshydratées (DHSt) car les VSI explorés dans la partie « Résultats » concernent principalement les gènes *KCNN4* et *PIEZO1* responsables de ces maladies.

2 Etat de l'art

2.1 Le globule rouge

2.1.1 Sa naissance

Chez l'Homme, les cellules érythroïdes sont les premières cellules spécialisées à apparaître chez l'embryon en post-implantation à J17 et ce au niveau de la vésicule vitelline (Baron et al., 2012). Elles permettent l'apport d'oxygène aux tissus et le développement des réseaux vasculaires. Chez les mammifères l'érythropoïèse se décline en 3 vagues : la première avec l'émergence des cellules érythroïdes « primitives » qui expriment les chaînes embryonnaires de globine et se situent au niveau de la vésicule vitelline, puis une seconde vague avec l'émergence du progéniteur erythro-myéloïde (PEM) dans la vésicule vitelline qui va migrer vers le foie fœtal produisant les cellules érythroïdes « définitives ». La troisième vague correspond à l'apparition des cellules souches hématopoïétiques depuis l'endothélium haémogénique du mésonéphros et de la moelle osseuse pour produire les cellules érythroïdes « définitives » (Nandakumar et al., 2016). Ces vagues se déroulent en parallèle de la synthèse des hémoglobines –(Hb) embryonnaires puis fœtales et enfin adultes (Figure 1).

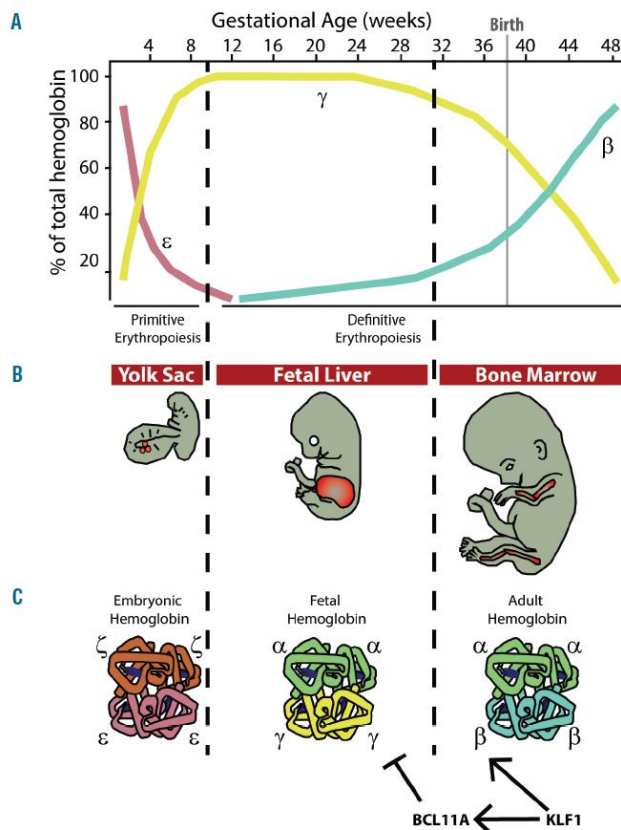


Figure 1 : Erythropoïèse humaine et expression des hémoglobines

Adapté de (Cantú and Philipsen, 2014)

A- Switch de l'hémoglobine chez l'Homme. Aux alentours de la semaine 6 de gestation la chaîne epsilon de globine disparaît au profit de la chaîne gamma de globine. Puis aux alentours de la naissance le switch se fait vers la chaîne beta. B- Sites majeurs de l'érythropoïèse durant le développement. Durant les 8 premières semaines l'érythropoïèse a lieu dans les îlots sanguins de la vésicule vitelline puis au niveau du foie fœtal jusqu'à la 32^{ème} semaine et en dernier lieu dans la moelle osseuse à partir de la 32^{ème} semaine de grossesse. Aux alentours de la naissance la rate devient aussi un organe transitoire de l'érythropoïèse. C- Structure des principales hémoglobines humaines exprimées pendant le développement. Hémoglobine embryonnaire Gower-1 ζ₂ε₂, hémoglobine fœtale α₂γ₂ et hémoglobine adulte α₂β₂. *KLF1* et *BCL11A* sont des facteurs de transcription avec des rôles clé dans la régulation de l'expression de chaînes de globines pendant le développement. En particulier *KLF1* active la production de beta globine et de *BCL11A* qui en retour inhibe l'expression des chaînes gamma de globine.

Après la naissance et avant l'âge de 5 ans l'érythropoïèse a lieu au niveau de la moelle osseuse de tous les os puis au niveau des os plats (sternum, côtes, os iliaques) et dans les épiphyses des os longs. L'érythropoïèse débute à partir de la cellule souche hématopoïétique (CSH) qui va se différencier en « megakaryocyte-erythroid progenitor » (MEP) puis en BFU-E (burst forming unit-erythroid) et CFU-E (colony forming unit-erythroid) jusqu'à la première cellule identifiable morphologiquement sur un myélogramme : le proérythroblaste. Le proérythroblaste va subir une série de modifications avec réduction cytoplasmique et condensation de la chromatine du noyau en passant par l'érythroblaste basophile, polychromatophile, acidophile qui va subir la phase finale d'énucléation vers le réticulocyte et sa sortie de la moelle osseuse pour arriver enfin à la

maturation finale en globule rouge dans la circulation sanguine (Cantú and Philipsen, 2014) (Figure 2). La maturation terminale comprend la condensation de la chromatine, le relargage des histones, la sortie du cycle cellulaire, la polarisation nucléaire et la cytokinèse, l'énucléation, la disparition des organelles dont les mitochondries, et le remodelage de la membrane et du protéome de la cellule (Carayon et al., 2011; Liu et al., 2021; Mei et al., 2020). Le GR mature est une cellule de de 7,5 µm de diamètre sans noyau ni organites.

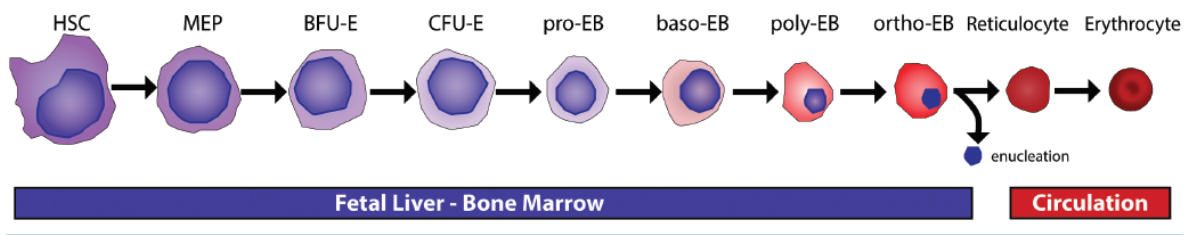


Figure 2 : Erythropoïèse chez l'adulte dans la moëlle osseuse.

Adapté de (Cantú and Philipsen, 2014)

MEP = megakaryocyte erythroid progenitor, BFU-E = burst forming unit erythroid, CFU-E = colony forming unit erythroid, EB = erythroblaste, baso = basophile, poly = polychromatophile, ortho = orthochromatophile ou acidophile.

2.1.2 Sa structure, ses propriétés

2.1.2.1 La structure du GR

Le GR est une cellule sans noyau biconcave de 7,5 µm de diamètre dont la durée de vie est de 120 +/- 10 jours. Son principal rôle est la distribution d'O₂ aux organes qui impose son passage par les microcapillaires de la circulation sanguine dont le diamètre peut être inférieur à son diamètre de l'ordre parfois de 3 µm.

2.1.2.1.1 La membrane du GR

La membrane du GR se compose d'une bicouche phospholipidique reliée au cytosquelette membranaire par des interactions protéine-protéine et lipide-protéine. La membrane se compose également d'une partie glucidique entièrement extra-cellulaire que nous ne détaillerons pas ici.

2.1.2.1.1.1 La bicouche phospholipidique

La bicouche phospholipidique se compose de différents lipides dont la phosphatidylsérine (PS) (Arashiki and Takakuwa, 2017) qui se démarque par son rôle particulier. L'asymétrie de distribution de la PS est essentielle entre autres signaux pour la survie du GR. En effet, chez un GR « jeune » et non pathologique la PS est activement contingentée sur la face interne de la bicouche phospholipidique. La PS interagit avec la spectrine et contribue ainsi à maintenir la forme du GR et sa déformabilité. L'exposition de PS à la face externe de la membrane est un signal

de phagocytose appelé « eat me signal » qui permet aux érythrocytes sénescents d'être reconnus et détruits par les macrophages de la rate (Arias and Arias, 2017; de Back et al., 2014). Cette asymétrie de distribution est régulée par des enzymes de type flippases ATP dépendantes et scramblases calcium sensibles (Figure 3).

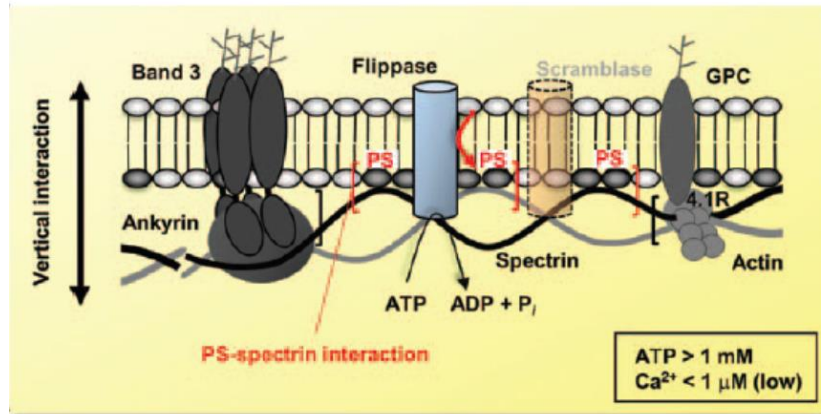


Figure 3 : Structure de la membrane d'un GR « jeune » avant 120 jours

Adapté de Arashiki and Takakuwa, 2017

La bicouche phospholipidique agit comme une barrière de rétention des cations et des anions dans le GR et permet la diffusion passive selon l'osmolalité intra- et extracellulaire de molécules d'eau directement à travers la bicouche phospholipidique (perméabilité de diffusion, processus lent et température dépendant) ou via les aquaporines (processus rapide, température indépendant) (Brown, 2017). Les GR humains ont une concentration intracellulaire en K^+ élevée et une concentration intracellulaire en Na^+ faible comparativement et ce à l'inverse des concentrations plasmatiques. Ce gradient cationique est permis par des transporteurs cationiques ATP dépendants notamment la pompe $3Na^+/2K^+$ ATP-dépendante qui permettent de maintenir ces concentrations. L'homéostasie du volume érythrocytaire est assurée par la faible perméabilité aux cations (qui permet une économie d'énergie) et une grande perméabilité aux solutés neutres (Lew and Tiffert, 2017). Le transport ionique et l'état d'hydratation qui en résulte est assuré via la membrane du GR par des diffusions passives d'ions ou d'eau, de glucose ou d'urée, des transports actifs via des canaux ATP dépendants (pompe $3Na^+/2K^+$ ATP dépendante, PMCA = plasma membrane calcium pump ATP dépendante), des canaux mécanosensibles (comme PIEZO1 qui est un canal cationique notamment calcique mécanosensible) ou calcium dépendant comme le canal GARDOS (canal potassique calcium dépendant).

2.1.2.1.1.2 Le cytosquelette membranaire

Le cytosquelette du GR se compose d'un réseau de 40 à 90 nm d'épaisseur fait de spectrine (en majorité), d'actine et de ses protéines associées (tropomyosine, tropomoduline, adducine et la dematine), de protéine 4.1 et d'ankyrine (Figure 4). On décompte environ 20 protéines majeures

et près de 850 mineures (Andolfo et al., 2016). La déformabilité est une propriété physique clé du GR (Huisjes et al., 2018) et dépend principalement des caractéristiques de la membrane du GR.

L'ensemble des protéines de la membrane est organisé en complexes macromoléculaires centrés autour de la bande 3 ou échangeur anionique $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ qui est la protéine la plus abondante de la membrane (1,5 millions de copies par GR). La protéine bande 3 codée par le gène *SLC4A1* a deux principales fonctions, une codée par sa partie N-terminale qui permet l'attachement vertical au cytosquelette membranaire, aux enzymes de la glycolyse et à la déoxyhémoglobine et dans sa partie C-terminale une fonction d'échangeur anionique contribuant au transport de dioxyde de carbone et des ions Chlorures. On distingue le réseau vertical d'interactions protéines-protéines : bande 3-ankyrine-spectrine et glycophorine C-protéine 4.1-spectrine-actine et protéine-lipide avec l'interaction PS-spectrine. Les interactions horizontales concernent principalement les interactions des dimères de spectrine entre eux, les interactions spectrine-actine-protéine 4.1 (Figure 4).

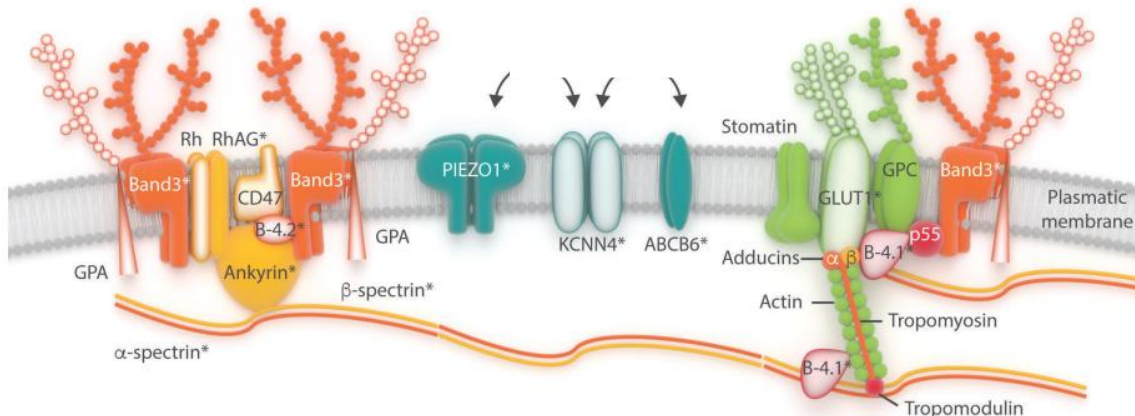


Figure 4 : Schéma de la membrane du globule rouge

Adapté de (Andolfo et al., 2016)

Protéines transmembranaires avec des fonctions de transporteur : bande 3 qui est un échangeur anionique $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$; GLUT1 qui transporte le glucose et l'acide L-dehydroascorbique, RhAG qui transporte des gaz notamment le CO_2 , PIEZO1 canal cationique mécanosensible, GARDOS canal potassique calcium dépendant. GPA = glycophorine A, Rh = rhésus polypeptide, B-4.1 = protéine 4.1, B-4.2 = protéine 4.2, GPC = glycophorine C, RhAG = Rh-associated glycoprotein, * = protéines connues en pathologie humaine.

La spectrine s'organise en tétramères de spectrine apha et beta. Elle se compose de 2 chaînes parallèles alpha et beta-orientées en directions opposées. Chaque chaîne contient de nombreux motifs répétés avec des domaines plus spécialisés dans la fixation à l'ankyrine ou à la protéine 4.1 ou 4.2, ou à l'actine ou à d'autres protéines. En moyenne 6 spectrines se fixent par filament d'actine conduisant à la formation d'un réseau pseudo-hexagonal (Figure 5).

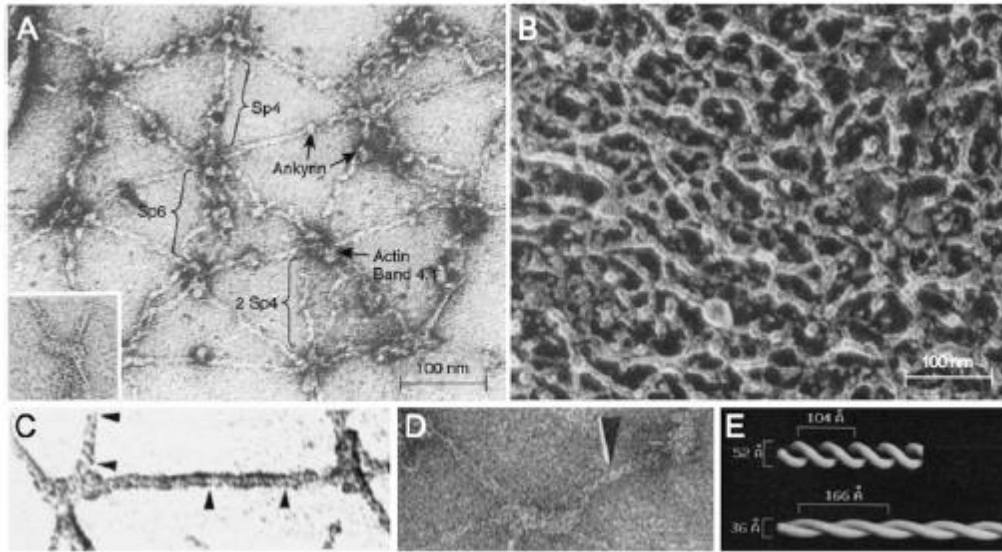


Figure 5 : Microscopie électronique du cytosquelette membranaire du GR avec visualisation des réseaux de spectrine

Adapté de (Lux, 2016)

A : organisation pseudo-hexagonale B : cytosquelette visualisé in situ ; C-D : spectrine ; E : modèle d'organisation de la spectrine.

La restructuration de la membrane joue un rôle dans la maturation finale des réticulocytes avec remodelage protéique et perte d'organelles en lien avec une conformation spécifique de la membrane (Liu et al., 2021).

2.1.2.1.2 Les principaux canaux d'intérêt

Les canaux PIEZO1 et GARDOS (Kaestner et al., 2020) sont mutés dans les stomatocytoses héréditaires déshydratées et font l'objet de résultats d'études détaillées dans la partie « Résultats » de cette thèse (Figure 6).

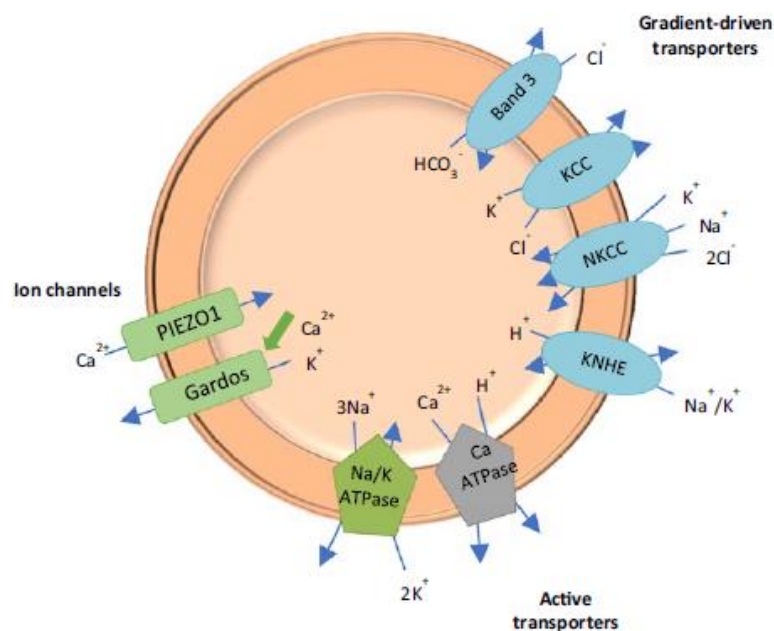


Figure 6 : Principaux canaux de la membrane du GR régulant les flux ioniques.

Adapté de (Caulier et al., 2018)

2.1.2.1.2.1 Le canal PIEZO1

Le gène *PIEZO1* code un mécanorécepteur (J. Guo et al., 2021; Jankovsky et al., 2021) permettant l'entrée dans la cellule de cations dont le Ca^{2+} en réponse à une stimulation mécanique. Ce canal s'exprime dans de nombreux types cellulaires et est impliqué dans divers processus physiologiques incluant le développement vasculaire et lymphatique, la régulation de la pression artérielle, l'ostéogenèse, l'angiogenèse, la régulation du volume des GR, l'érythropoïèse, le métabolisme du fer (Figure 7) (Caulier et al., 2020; J. Guo et al., 2021; Ma et al., 2021; Agliatoro et al., 2021). *PIEZO1* à la surface des GR permet de réguler l'état d'hydratation du GR. Cet équilibre est indispensable pour maintenir le ratio surface/volume du GR permettant de résister aux modifications d'osmolarité et de forces de cisaillement conditionnées par la circulation sanguine. Cette régulation permet aux GR d'adapter leur forme participant en partie à leur propriété de déformabilité indispensable pour leur passage notamment à travers les capillaires étroits de la rate (Danielczok et al., 2017; Safeukui et al., 2018). En cas de contrainte mécanique le canal est activé et le pore s'ouvre permettant l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule induisant l'activation du canal *GARDOS* et une déshydratation de la cellule avec perte de K^+ et d'eau (Cahalan et al., 2015; Svetina et al., 2019). La contrainte mécanique est induite par une déformation de la membrane plasmique du GR conduisant à une rotation des pales du canal transmettant ce signal de déformation au domaine extracellulaire, puis au domaine intracellulaire et permettant l'ouverture du pore par un mécanisme de levier (Zhao et al., 2019) (Figure 8).

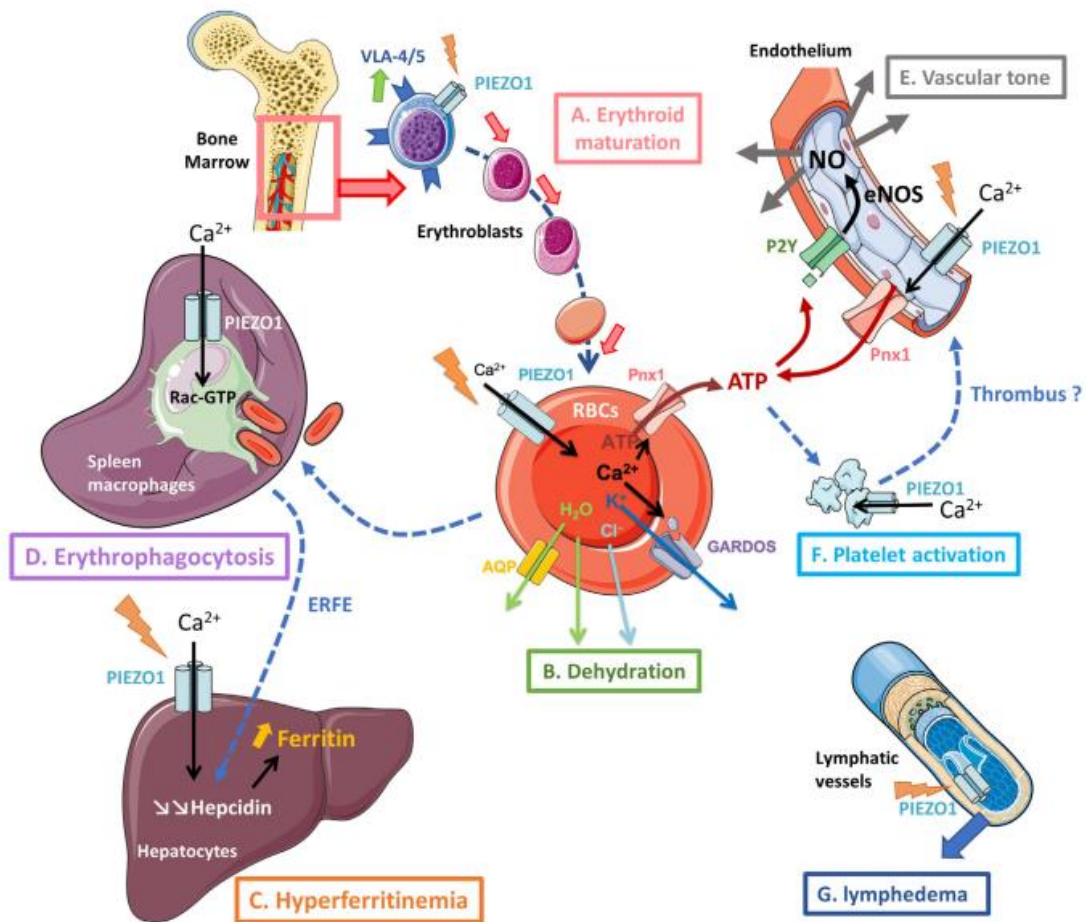


Figure 7 : Vue schématique des différents tissus de l'organisme humain exprimant PIEZO1 et ses rôles spécifiques

Adapté de (Jankovsky et al., 2021)

A- Rôle pendant l'érythropoïèse, PIEZO1 joue un rôle dans la maturation érythroïde. B- Dans le GR mature l'activation de PIEZO1 conduit à l'entrée de calcium dans la cellule conduisant à l'activation du canal Gardos avec sortie de potassium déshydratation et hémolyse, à la sortie d'ATP (due à l'activation de la pannexine 1) et à la diminution de production de 2,3 BPG augmentant l'affinité de l'Hb pour l'O₂. C- Dans les hépatocytes, l'activation de PIEZO1 et l'entrée de Ca²⁺ conduit à une inhibition de la production d'hepcidine avec augmentation de l'absorption intestinale du fer et augmentation des taux de ferritine. D- Dans les macrophages, l'activation de PIEZO1 conduit à une augmentation de l'érythrophagocytose et du turnover des GR avec stimulation de l'érythropoïèse. E- Dans les cellules endothéliales, l'activation de PIEZO1 conduit à une perte d'ATP et une augmentation de la production de NO avec une vasodilatation. F- dans les plaquettes l'activation de PIEZO1 conduit via le Ca²⁺ au signal prothrombotique. G- Dans le système lymphatique l'activité de PIEZO1 permet le développement et le maintien des valves lymphatiques.

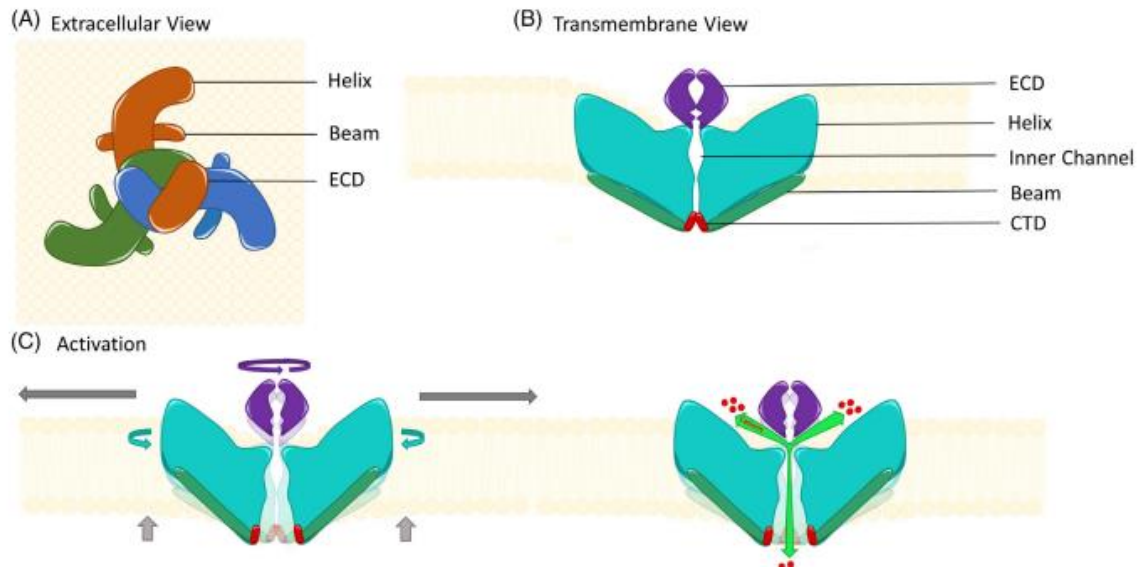


Figure 8 : Structure de PIEZO1

Adapté de Jankovski *et al* 2021

Homotrimer dont l'activation est due à une stimulation mécanique ; ECD = extra cellular domain, Helix = hélice, Inner channel = pore interne, Beam = CTD = intra cellular domain, beam = balancier ou bras

2.1.2.1.2.2 Le canal Gardos

Le canal Gardos a d'abord été mis en évidence par sa fonction. En effet, en 1956 puis en 1958 Georges Gardos met en évidence une augmentation de la perméabilité du GR au K^+ médiée par le Calcium inhibée par des chélateurs du calcium comme l'EDTA. Cette augmentation de la perméabilité du GR au K^+ calcium dépendant a été baptisée « Gardos effect » (Gardos, 1956, 1958). Ce canal est codé par le gène *KCNN4* et porte différents noms : *KCNN4*, *KCa3.1*, *IK1* ou *SK4*. Il est formé de 4 sous-unités identiques chacune formée de 6 domaines transmembranaires (S1 à S6) et d'un domaine P-loop = pore situé entre S5 et S6. La calmoduline (protéine se liant au Ca^{2+}) est fixée à la partie C-terminale de chaque sous-unité (Roach and Bradding, 2020) (Figure 9). Il s'exprime au niveau des cellules hématopoïétiques dont les GR, les lymphocytes et les plaquettes. Il s'exprime en faible quantité à la surface des plaquettes (Wright and Mahaut-Smith, 2021) et des GR (Brugnara et al., 1996). Il est également retrouvé au niveau des épithélia sécrétoires : côlon, pancréas, glandes salivaires où il joue un rôle dans la sécrétion de fluides et la régulation du volume cellulaire (Thompson-Vest et al., 2006). Il est impliqué dans la régulation du volume cellulaire notamment des GR, la mort cellulaire (Maher and Kuchel, 2003; Kaestner et al., 2020; Klei et al., 2020) et aurait un rôle dans les fonctions plaquettaires (Wright and Mahaut-Smith, 2021).

Le « Gardos effect » est également observé chez les patients drépanocytaires. Il est dû à une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire suite à l'activation d'un canal cationique

non sélectif (qui n'est pas PIEZO1) non connu à ce jour et dénommé « P-sickle » (Lew and Bookchin, 2005a).

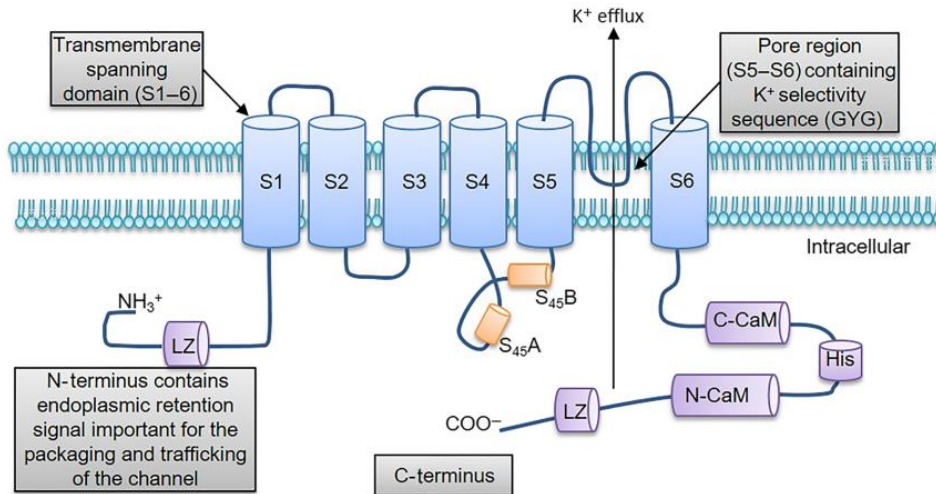


Figure 9 : Structure du canal Gardos ou Kca3.1

Adapté de (Roach and Bradding, 2020)

6 DTM (domaine transmembranaire) S1 à S6, pore entre S5 et S6. Les parties N terminale (N-Ter) et C terminale (C-Ter) sont intracellulaires, le site de fixation à la calmoduline permettant l'ouverture du canal est situé dans la partie C ter : C-Cam, N-Cam. Il y a deux domaines LZ = leucine zipper nécessaires à l'assemblage du canal et son adressage. Le canal actif est un homotétramère

Une concentration intracellulaire en calcium de 200 à 400 nM est nécessaire pour l'activation du canal. Le gène codant pour ce canal a été identifié en 2003 (Hoffman et al., 2003) et les mutations impliquées dans le syndrome de Gardos en 2015. Ce sont des mutations gain de fonction du gène *KCNN4* qui ont été mises en évidence dans ce sous-type de stomatocytose héréditaire déshydratée (Rapetti-Mauss et al., 2015). Elles conduisent à une augmentation de la sensibilité du canal Gardos au calcium, qui s'active aux concentrations intracellulaires physiologiques en calcium. Elles concernent principalement le domaine de fixation à la calmoduline.

2.1.2.2 Les principales propriétés du GR

2.1.2.2.1 La déformabilité

Le rôle des globules rouges implique la nécessité d'une grande adaptabilité de forme et donc d'une importante capacité de déformation principalement liée aux propriétés de sa membrane. La déformabilité dépend du ratio surface/volume (qui est de 1,56 pour un GR sain et qui correspond à une grande surface d'échange par rapport au volume), de la viscosité interne qui dépend de la concentration en hémoglobine et de son état, et de la viscoélasticité (Mohandas et al., 1980; Mohandas and Gallagher, 2008; Li and Lykotrafitis, 2014; Lux, 2016; Gokhin et al., 2015; Jani et al., 2020; Nigra et al., 2020; Corrons et al., 2021) (Figure 10).

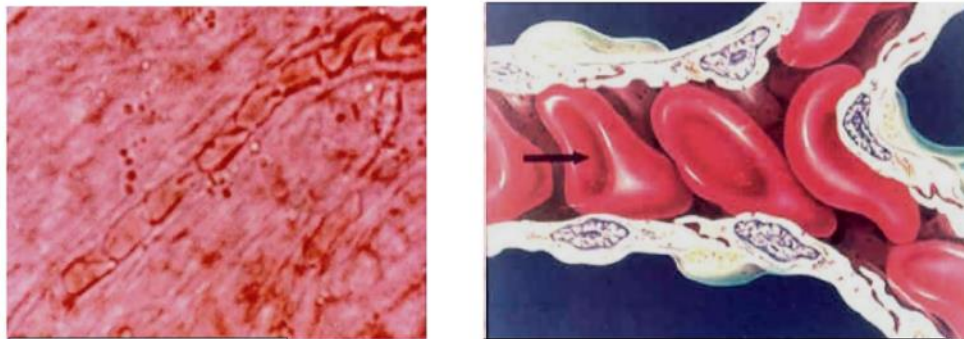


Figure 10 : Observation de la microcirculation capillaire par capillaroscopie diamètre de 3 à 8 μm

Adapté de (Corrons et al., 2021)

Déformabilité des GR au moment du passage dans la microcirculation capillaire

2.1.2.2.2 La densité des GR

La densité du GR est une autre caractéristique majeure du GR. Elle est en partie médiée par les concentrations ioniques intracellulaires et le contenu en hémoglobine (Bartolucci et al., 2012a; Ilboudo et al., 2017; Shmukler et al., 2019). Une cellule dense érythrocytaire est définie par une densité mesurée supérieure à 1,1056 g/ml (Clark et al., 1982) ou $>1,110$ (Bartolucci et al., 2012a) avec une concentration intracellulaire en hémoglobine (CCMH) >41 g/dl (pour une normale <35 g/dl). Les cellules hyperdenses érythrocytaires sont associées à la drépanocytose et se caractérisent par une rigidité et une diminution de leur stabilité. Il ne s'agit pas que de cellules falciformées de manière irréversible. Chez un patient avec un syndrome drépanocytaire majeur (SDM) le pourcentage de cellules denses est en moyenne de $12,8\% \pm 7,9\%$ toutes origines ethniques confondues (Bartolucci et al., 2012a). Ce taux est corrélé au degré d'hémolyse (plus il y a de cellules denses plus il y a de l'hémolyse), et associé cliniquement à la présence d'ulcères cutanés, de priapisme et de dysfonction rénale. De nombreuses techniques existent pour déterminer le taux de cellules denses : celles basées sur la centrifugation (Murphy, 1973; Corry et al., 1982), sur la séparation en gradient de percoll (Rennie et al., 1979), en gradient de phtalates (Danon and Marikovsky, 1964), en gradient de Stractan (Clark et al., 1982) et des techniques plus récentes automatisées utilisant les automates d'hématologie classiques comme l'Advia® (Siemens) (Sadaf et al., 2020) et des approches plus novatrices basées sur de la lévitation magnétique en microfluidique cellule par cellule (Goreke et al., 2022).

2.1.3 Ses principales fonctions, sa raison d'être

La fonction dite canonique du GR est le transport d'oxygène (O_2) des poumons vers les tissus puis le transport de dioxyde de carbone (CO_2) des tissus vers les poumons. Ce transport est principalement médié par l'hémoglobine. Des fonctions dites non canoniques existent et sont de plus en plus décrites : rôle dans le métabolisme du monoxyde de carbone (NO), une action anti-oxydante, une action érythrocrine par relargage de molécules bioactives comme le NO, les métabolites du NO et l'ATP (Figure 11) (Kuhn et al., 2017).

L'hémoglobine est une protéine hétérotétramérique de 64 kDa appartenant à la superfamille des globulines (Frimat et al., 2019). L'hémoglobine adulte humaine est formée de deux chaînes alpha de globine et de deux chaînes beta de globine reliées chacune à une molécule d'hème et un ion Fer sous forme réduite Fe^{2+} (sous forme oxydée avec un ion Fe^{3+} elle devient de la méthémoglobine dont l'affinité pour l' O_2 est effondrée) (Figure 12). Sous sa forme réduite, elle permet le transport d' O_2 . L'hème est une molécule ubiquitaire composant de différentes hémoprotéines. Le groupement prosthétique de l'hème est formé d'un noyau tétrapyrrole aussi appelé protoporphyrine IX. Chaque molécule d'hème est fixée à un atome de fer Fe^{2+} qui possède six sites de liaisons dont deux libres pouvant être occupés par l' O_2 , le CO ou le NO. La lutte contre l'oxydation est primordiale dans le GR. L'hème est localisé dans une poche hydrophobe de l'hémoglobine. La majeure partie du CO_2 est transformée en ion HCO_3^- par la réaction catalysée par l'anhydrase carbonique entre le CO_2 et l' H_2O . Une autre partie du CO_2 peut également se fixer directement à l'hémoglobine (une molécule de CO_2 par hémoglobine) pour former la carboxyhémoglobine qui a une affinité diminuée pour l' O_2 . On parle d'effet Haldane. L' O_2 se fixe sur l'atome ferreux Fe^{2+} de l'hème et cette fixation est régulée par la pression en O_2 (PO_2), le pH et les taux de 2,3 biphosphoglycérate (2,3 BPG) qui a une affinité pour l'hémoglobine supérieure à l' O_2 (Figure 13). On parle d'effet Bohr (Malte and Lykkeboe, 2018) qui régule la fixation de l' O_2 à l'hémoglobine. La synthèse de 2,3 BPG nécessite la consommation d'une molécule d'ATP.

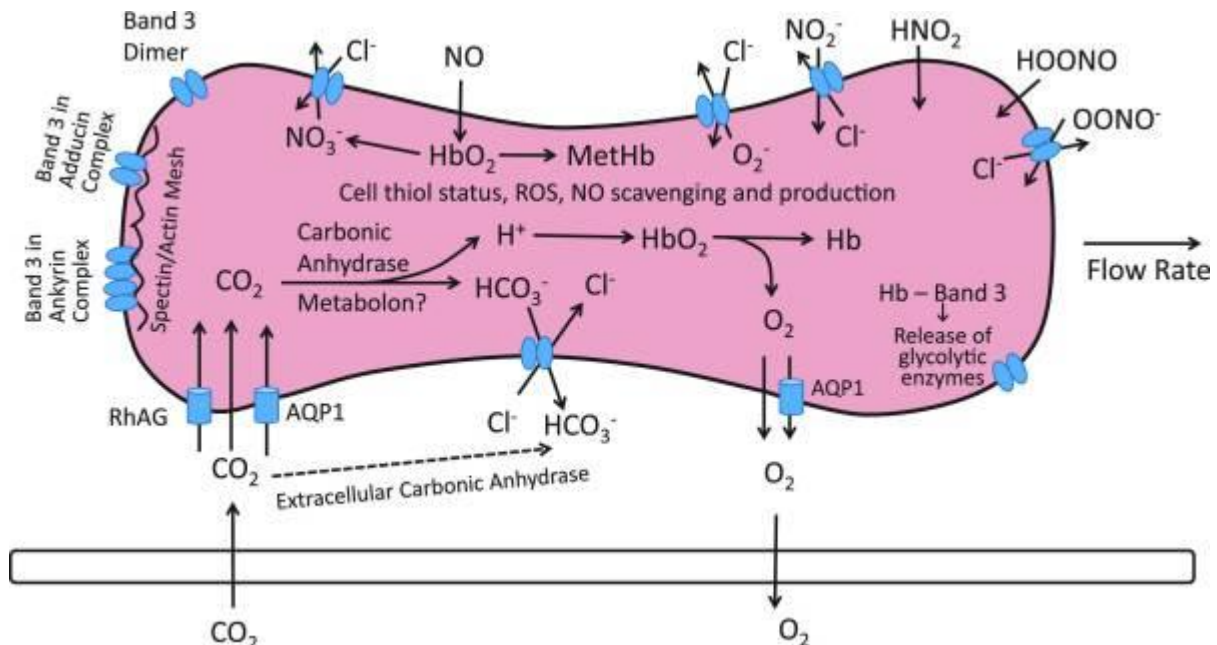


Figure 11 : Schéma des échanges gazeux au niveau du système capillaire

Adapté de (Jennings, 2021)

Le CO_2 peut entrer dans la cellule par diffusion passive, via l'aquaporine 1 ou le transporteur RhAG. Le CO_2 cytoplasmique subit une hydratation par une molécule d'eau via l'anhydrase carbonique. Les ions bicarbonates ainsi formés sont transportés à l'extérieur via la bande 3 en échange

de Cl⁻. L'ion H⁺ libéré lors de cette réaction est pris en charge par l'hémoglobine qui exerce ainsi son pouvoir tampon de régulation du pH et qui libère simultanément son O₂ en réponse à l'efflux d'O₂ de la cellule par diffusion passive et via l'aquaporine 1 (AQP1). En parallèle de la captation et du traitement du CO₂ et du relargage d'O₂ le GR s'occupe de l'épuration du NO et du transport des métabolites issus du NO via la bande 3 ou par diffusion des acides non dissociés. Il existe aussi une faible proportion du CO₂ qui est hydraté dans le plasma par l'anhydrase carbonique extracellulaire.

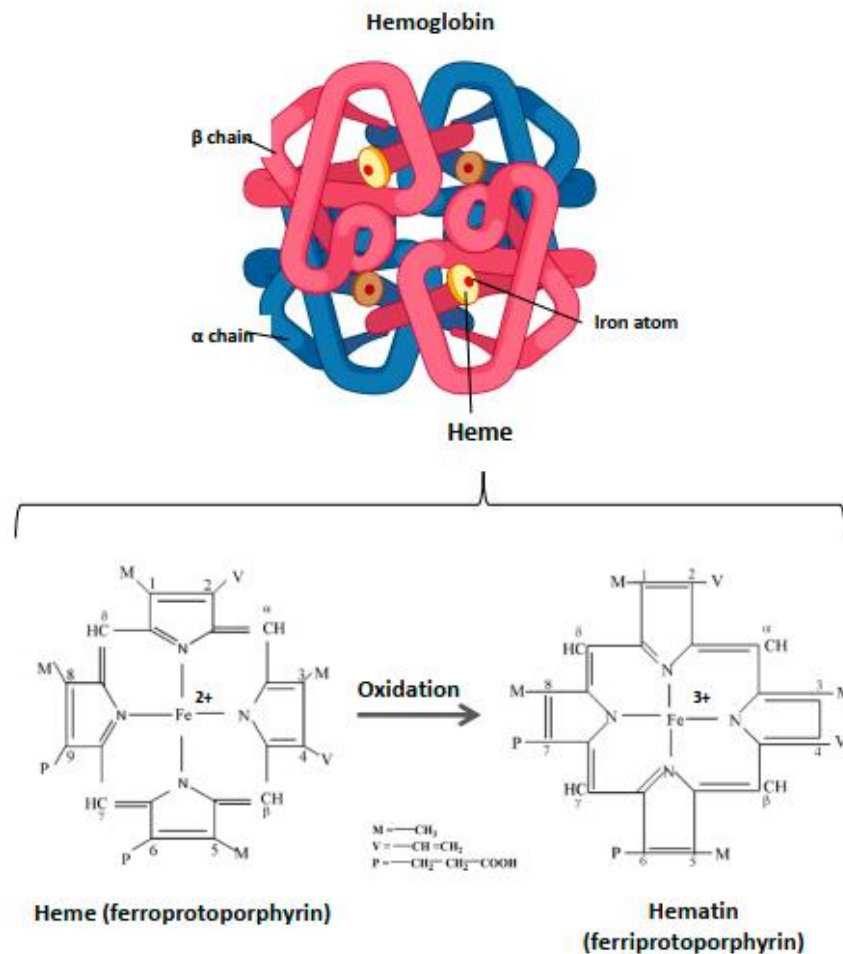


Figure 12 : Structure de l'hémoglobine et de l'hème.

Adapté de (Frimat et al., 2019)

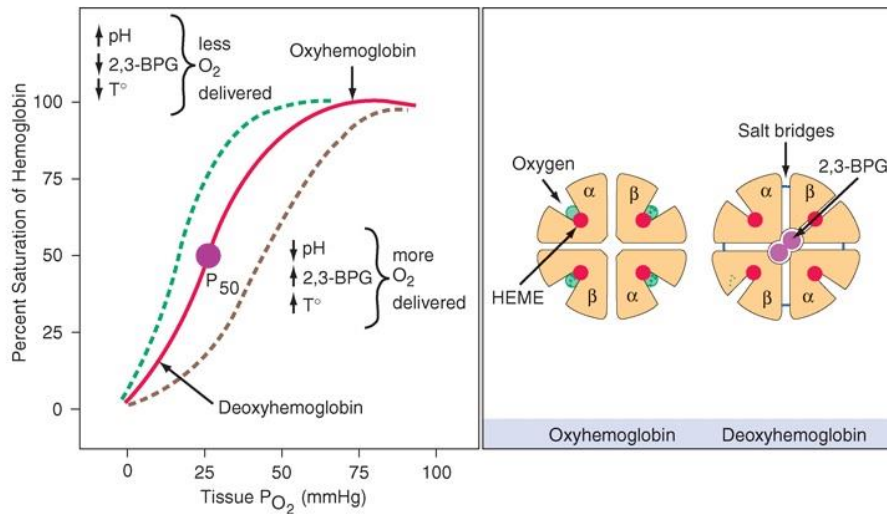


Figure 13 : Courbe de dissociation de l'Hb en fonction de la PO_2

Adapté du blog du [PULSE OXIMETRY – Dr Rajiv Desai \(drrajivdesaimd.com\)](http://drrajivdesaimd.com) <http://drrajivdesaimd.com/2015/08/24/pulse-oximetry/>

Il existe également des fonctions dites non canoniques (en dehors du transport d' O_2 aux tissus) comme le contrôle du métabolisme du monoxyde d'azote (NO), la fonction redox de lutte contre les radicaux libres (comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2), la modulation de la rhéologie sanguine et la viscosité. La fonction redox par exemple passe par des molécules antioxydantes comme le glutathion, l'acide ascorbique (vitamine C), l'alpha tocophérol (vitamine E), grâce à des sources de NADH et NADPH (formes réduites de co-facteurs) que sont la glycolyse et la voie des pentoses et des enzymes anti oxydantes comme la superoxyde dismutase SOD1, la catalase, le système thioredoxine et la glutathion peroxydase (Kuhn et al., 2017).

2.1.4 Sa mort, l'hémolyse quelques notions clés

L'hémolyse est un processus physiologique permettant la dégradation des GR « âgés ». Le vieillissement du GR se caractérise par une perte de déformabilité due à une vésiculation de la membrane conduisant à une perte de surface membranaire, une perte des acides sialiques de la membrane, une augmentation du calcium intracellulaire conduisant entre autres à une exposition de phosphatidylserine sur la face externe de la membrane du GR et une déshydratation, une déplétion en ATP et une activation des molécules d'adhésion (Klei et al., 2020; McMahon et al., 2021; Thiagarajan et al., 2021). C'est la synergie des différentes dégradations fonctionnelles métaboliques qui conduit à la fin du GR.

Le GR mature de sujets adultes en bonne santé est une cellule sans noyau, sans organites (dont les mitochondries) et donc sans capacité de synthèse protéique. Sa production d'énergie est donc totalement dépendante de la voie de la glycolyse où le glucose est transformé en lactates via différentes voies enzymatiques (85% par la voie de la glycolyse dite d'Embden-Meyerhof et 15% via la voie des pentoses phosphates) (Figure 14).

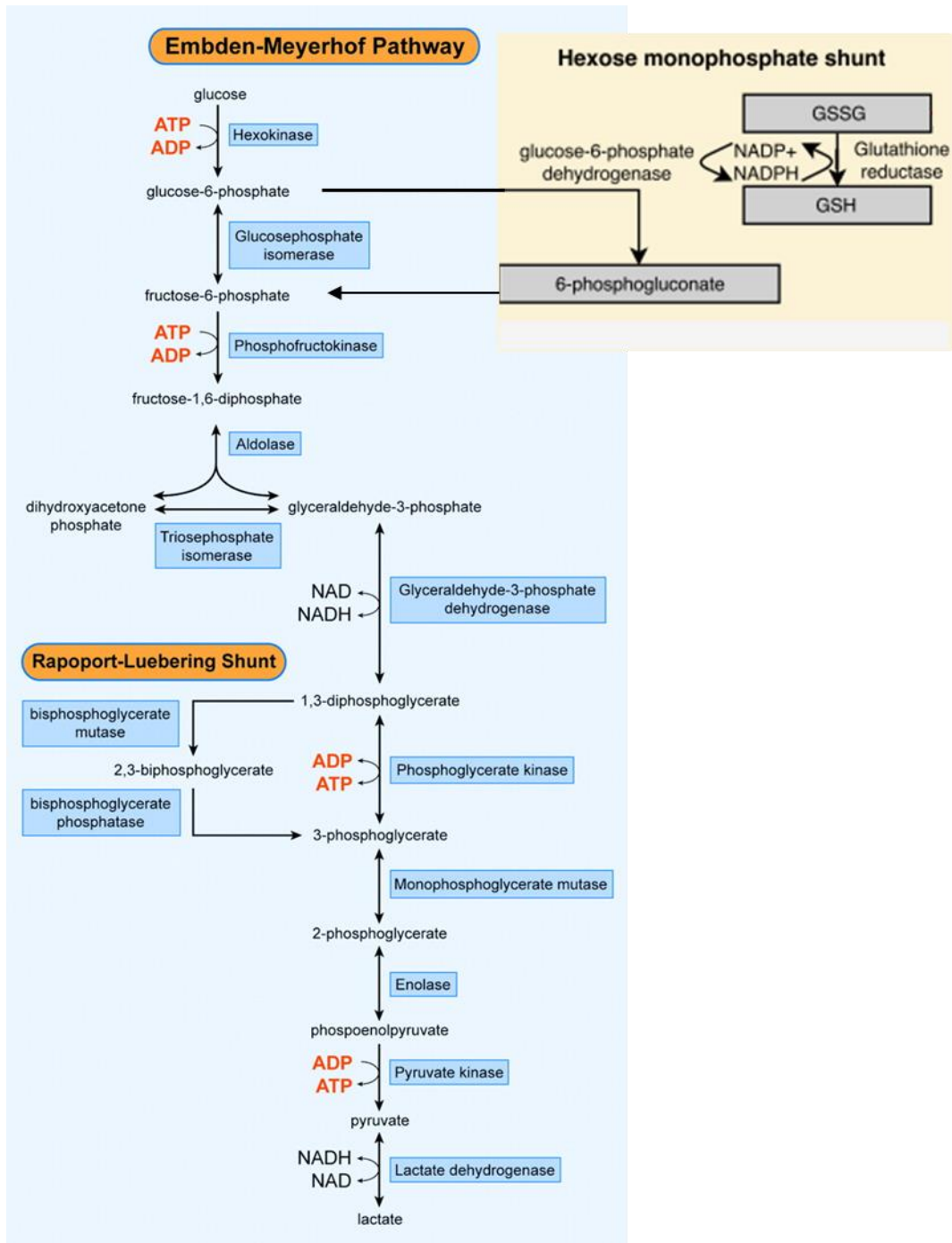


Figure 14 : Principales voies de la glycolyse dans le GR

Adapté de (van Wijk and van Solinge, 2005) et (Huisjes et al., 2018)

Les déficits en enzymes de cette voie (pathologiques ou physiologiques quand dus à la sénescence) conduisent à une diminution des stocks intracellulaires d'ATP qui contribuent à diminuer la déformabilité des GR.

Le GR a un stock énergétique (stock enzymatique) limité et subit des changements irréversibles dans son métabolisme. Le GR sénescence diminue son stock d'ATP (Klei et al., 2020; Seki et al., 2020) et voit donc les capacités des pompes ioniques ATP dépendantes comme la pompe $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$ ATP dépendante et le canal PMCA diminuer. Ceci conduit à une élévation de la concentration en calcium intracellulaire et à la déshydratation du GR (Lew and Tiffert, 2017). Les GR âgés sont détruits majoritairement par un mécanisme d'hémolyse intra-tissulaire (ou extra-vasculaire) (85%) par les macrophages du système réticulo-endothélial de la moelle osseuse, de la rate et dans une moindre mesure du foie et ce par un processus dit d'érythrophagocytose. Les GR sénescents peuvent également être détruits par un mécanisme d'hémolyse intra-vasculaire (15%) directement dans la circulation par fragmentation ou vésiculation en lien avec leur diminution de déformabilité (Alaarg et al., 2013; Huisjes et al., 2018; Leal et al., 2018; Sudnitsyna et al., 2020) dans les capillaires de taille réduite. Il y a environ 270 millions de molécules d'hémoglobine dans chaque GR et approximativement 3 millions de GR âgés détruits à chaque seconde pour 3 millions de nouveaux globules rouges produits par seconde. L'hémoglobine ainsi libérée va être dégradée dans les macrophages en hème et chaînes de globines. Les chaînes de globines vont être dégradées dans les lysosomes en acides aminés qui pourront être réutilisés. L'hème libérée est catabolisée par l'hème oxygénase (principalement l'isoforme HO-1) qui va ajouter une molécule d' O_2 à l'anneau porphyrinique de l'hème conduisant à son oxydation et à la libération de biliverdine, de fer libre et de CO. Le fer va être stocké via la ferritine ou exporté pour réutilisation via la ferroportine, puis la transferrine, la biliverdine est quant à elle transformée en bilirubine grâce à la biliverdine réductase. Une petite proportion de l'hème peut aussi sortir de la cellule via le transporteur de l'hème FLVCR1a et se retrouver dans la circulation à des concentrations qui demeurent très faibles en conditions physiologiques. Dans certaines hémolyses pathologiques les taux d'hème circulante peuvent être élevés. L'hémopexine peut alors prendre en charge cette hème circulante. Dans le cas des hémolyses intra-vasculaires, l'hémoglobine libérée se fixe à l'haptoglobine. L'haptoglobine est une glycoprotéine plasmatique synthétisée par le foie et appartenant à la famille des protéines de l'inflammation. Le complexe hémoglobine-haptoglobine se fixe au CD163 des macrophages tissulaires où il est inclus dans des vésicules d'endocytose puis dégradé et les globines sont dégradées dans les lysosomes et l'hème est catabolisé dans le cytoplasme par l'HO-1 comme décrit dans l'hémolyse extra-vasculaire. L'haptoglobine est rapidement saturable et l'hémoglobine libre en excès peut être filtrée par les reins et se retrouver dans les urines conduisant à une hémoglobinurie pathologique. L'hème générée dans la circulation par l'hémolyse intravasculaire peut être prise en charge par l'hémopexine. L'hémopexine est une glycoprotéine de l'inflammation et ses taux libres diminuent en cas d'hémolyse intra-vasculaire. En prenant en charge l'hème libre l'hémopexine contribue à prévenir les dommages oxydatifs liés à l'hème libre notamment au niveau vasculaire. Le complexe hème-hémopexine est reconnu par le CD91 macrophagique puis inclus dans des vésicules d'endocytose. Dans l'hémolyse intratissulaire l'haptoglobine est abaissée (= 0,1 – 0,5 g/L), et dans l'hémolyse

intravasculaire l'haptoglobine peut être indosable (< 0,03 g/L). L'hémolyse devient pathologique quand un de ces deux processus extra-vasculaire ou intra-vasculaire est amplifié (Figure 15, Figure 16 et Figure 17). La compensation de cette hémolyse par la moelle osseuse est un processus complexe qui doit tenir compte de l'aspect aigu ou chronique de l'hémolyse. L'anémie proprement dite, définie par une diminution de la concentration intra-érythrocytaire en hémoglobine, va apparaître quand les capacités de régénération de la moelle osseuse sont dépassées ou inefficaces comme dans le cas des maladies dysérythropoïétiques.

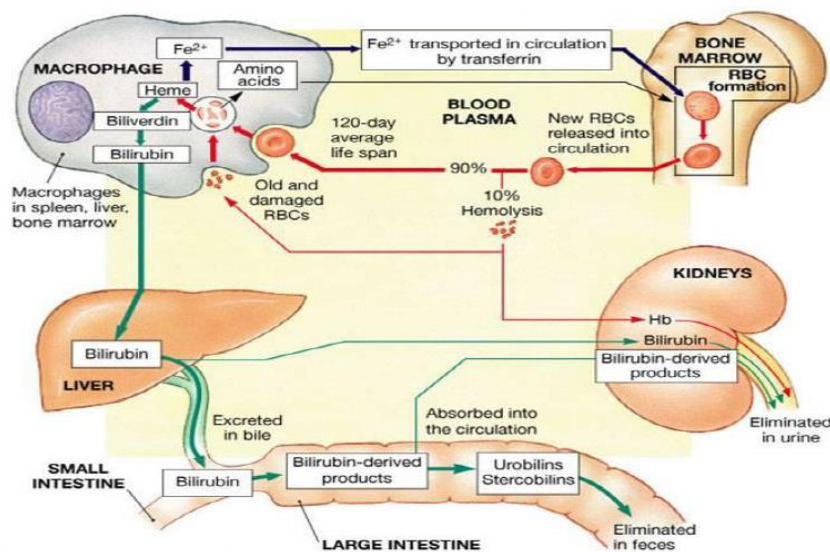


Figure 15 : Schéma simplifié de l'hémolyse extravasculaire physiologique

Adapté de http://ksumsc.com/download_center/

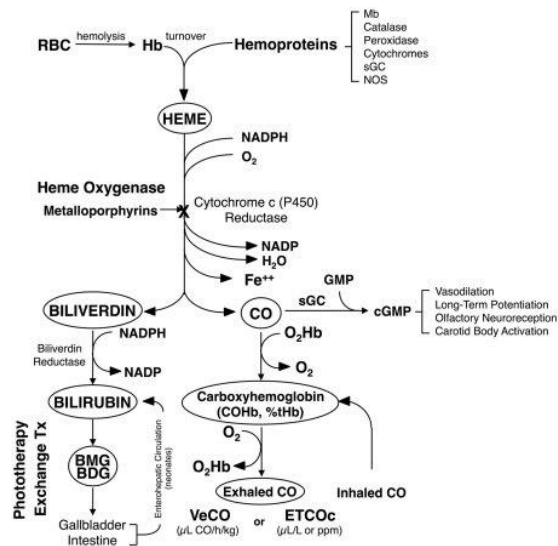


Figure 16 : Dégradation de l'hème

Adapté de (Kourula et al., 2012)

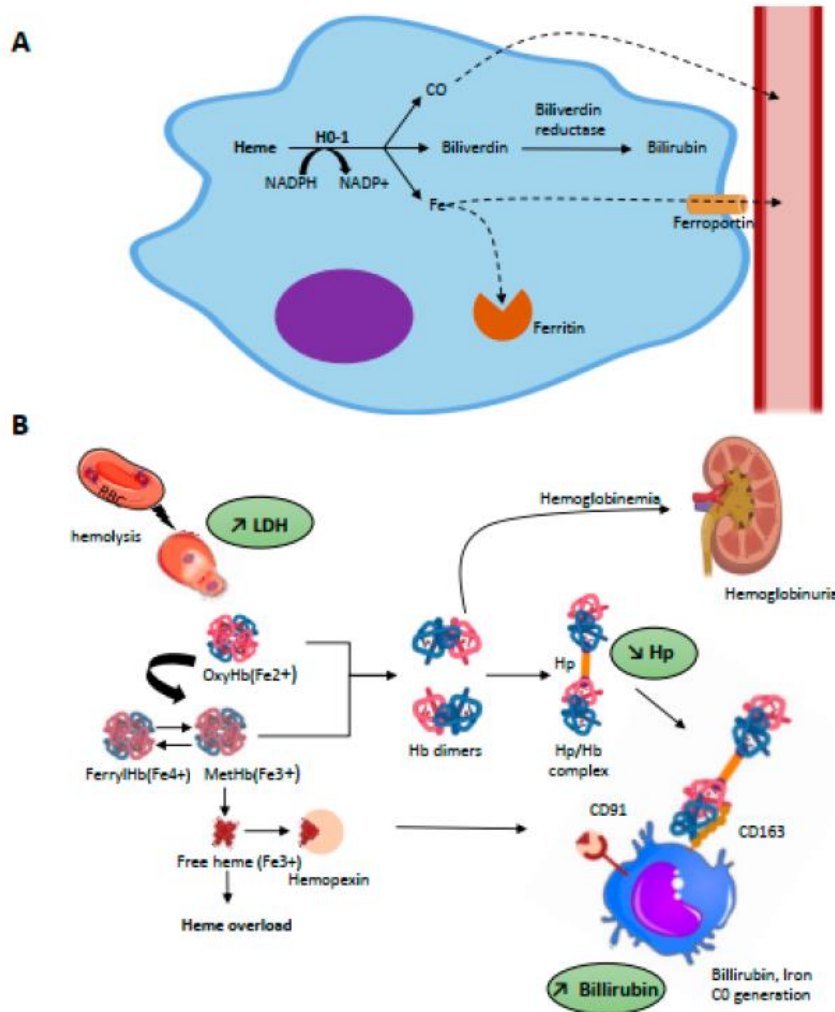


Figure 17 : Schéma du processus d'hémolyse.

A- Hémolyse extra-vasculaire. B- Hémolyse intra-vasculaire, adapté de (Frimat et al., 2019)

La rate «surveille» l'état de déformabilité des GR notamment via le signal « eat me » de la PS et « don't eat me » du CD47 (Arias and Arias, 2017; Corrons et al., 2021) et les fentes inter-endothéliales de diamètre 0,2 à 0,4 μm . Dans un GR sénescent la concentration en calcium intracellulaire augmente et active la scramblase qui conduit à l'exposition de la PS sur la face externe de la membrane représentant le signal « eat me ». Les GR sénescents et certains GR pathologiques comme ceux de la thalassémie et de la drépanocytose présentent ce signal PS « eat me » et sont aussitôt reconnus et pris en charge vers la phagocytose. Il s'agit d'une hémolyse pathologique comme retrouvée dans les anémies hémolytiques constitutionnelles. Le système de fente inter-endothéliales spléniques sert de filtre permettant de sortir de la circulation des GR présentant des altérations de taille, de forme et de déformabilité. Seules les cellules présentant une déformabilité normale peuvent passer ce filtre et en ressortir « entières » (Corrons et al.,

2021) (Figure 18). Il demeure cependant des exceptions et ce système n'est pas un « on-off » total.

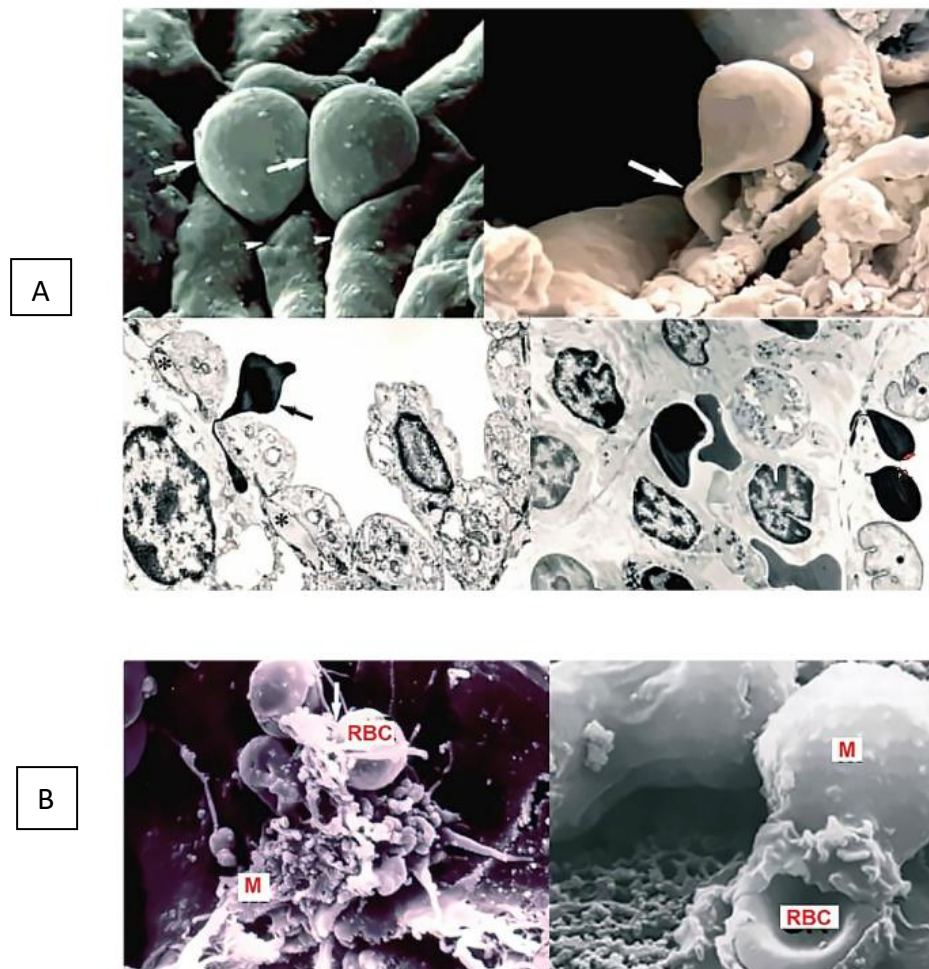


Figure 18 : Passage des GR par la rate

A- Passage des GR à travers les fentes inter-endothéliales spléniques (encadrés du haut)- B- Mort des GR = RBC dans la moelle osseuse phagocytés par les macrophages = M. Adapté de (Corrons et al., 2021)

2.2 Les anémies hémolytiques

2.2.1 Les formes constitutionnelles

Les anémies hémolytiques constitutionnelles (AHC) regroupent un ensemble de pathologies résultant d'une destruction prématurée des globules rouges fragilisés par un défaut d'origine corpusculaire et plus rarement extra-corpusculaire (Mohandas, 2018). L'hémolyse est dans ce cas pathologique et les GR sont détruits prématurément. L'érythropoïèse est stimulée par cette destruction en augmentant ses capacités de production. On observe alors souvent dans ces pathologies une hyperplasie de la lignée rouge au niveau de la moelle osseuse et la durée de fabrication érythrocytaire diminue. Dans les cas où l'hémolyse est parfaitement compensée l'anémie peut être absente. Des décompensations peuvent survenir au décours d'épisodes

infectieux ou autres événements conduisant à un stress physiologique (fièvre, grossesse...). Les AHC les plus fréquentes sont les hémoglobinopathies qualitatives dont la drépanocytose (Piel et al., 2017) et quantitatives avec les thalassémies (Taher et al., 2018), les déficits en enzymes du métabolisme du globule rouge (GR) avec le déficit en G6PD (Luzzatto et al., 2020) qui est le plus fréquent en Afrique (les formes les plus répandues en Afrique peuvent demeurer asymptomatiques ou prendre la forme d'une hémolyse aigue déclenchée) et le déficit en pyruvate kinase (Bianchi and Fermo, 2020) le plus fréquent en Europe, les anomalies de la membrane du GR (Gallagher, 2017; Kalfa, 2021; Mohandas and Gallagher, 2008), les syndromes hémolytiques et urémiques atypiques (SHUa) (Noris et al., 1993) et les dysérythroïèses congénitales (CDA) (Iolascon et al., n.d.; Niss et al., 2021) (Figure 19).

Les formes cliniques varient de formes asymptomatiques avec une hémolyse bien contrôlée et compensée à des formes transfuso-dépendantes parfois avant ou dès la naissance. L'âge de début est donc variable selon les pathologies et va de formes anténatales avec *hydrops foetalis* jusqu'au troisième âge pour les formes les plus modérées. Les seuls signes présents sont parfois les stigmates biologiques d'hémolyse compensée (taux de réticulocytes élevé, haptoglobine effondrée, bilirubine augmentée) ou ses conséquences cliniques comme l'ictère, les cholélithiases ou la surcharge en fer. La splénomégalie n'est pas constante et dépend de la pathologie et du degré d'hémolyse intra-tissulaire. Dans certains cas une splénectomie peut être envisagée et dans d'autres contre-indiquée à cause du risque de thromboses (Iolascon et al., 2017). La surcharge en fer est retrouvée dans les cas où il existe une dysérythroïèse comme dans les CDA ou les thalassémies voire les sphérocytoses héréditaires et les stomatocytoses héréditaires, les déficits en PK et ce même en l'absence de transfusions itératives ou d'hémochromatose génétique associée (Tanno and Miller, 2010; van Straaten et al., 2018). Dans ces derniers cas, la surcharge en fer est causée par une hyperabsorption intestinale du fer en lien avec une baisse de la synthèse d'hepcidine.

Le propos de cette thèse portera principalement sur l'étude fonctionnelle de variations présentes dans des gènes codant pour des protéines de membrane du GR. Nous développerons l'étude de cas « simplex » (un seul gène en cause) et de cas d'associations de variations siégeant dans des gènes codant pour des protéines de membrane du GR associées à la drépanocytose ou à la thalassémie.

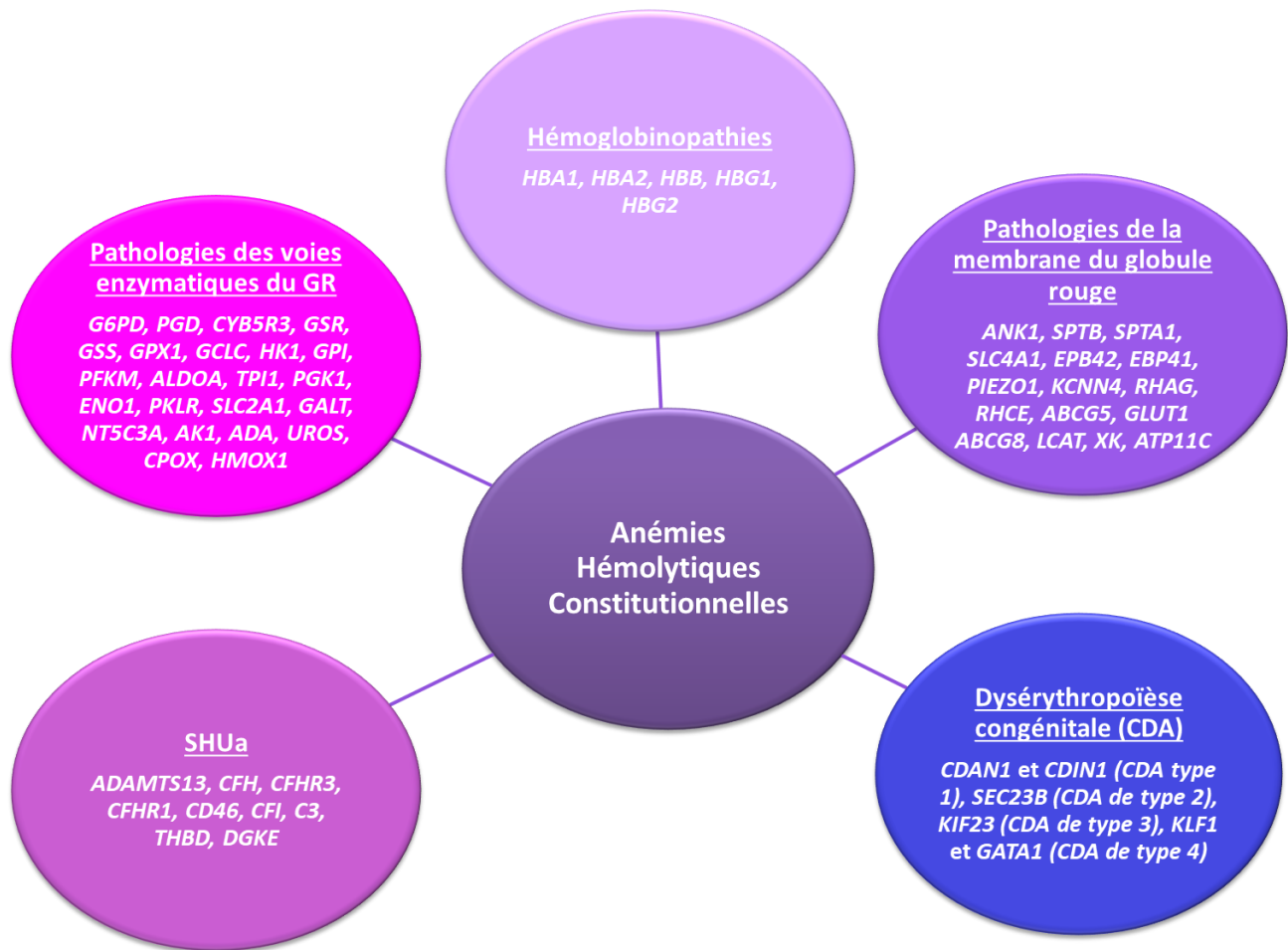


Figure 19 : Principales causes d'AHC et en italique les principaux gènes connus aujourd'hui en diagnostic dans ces pathologies dans les formes non syndromiques

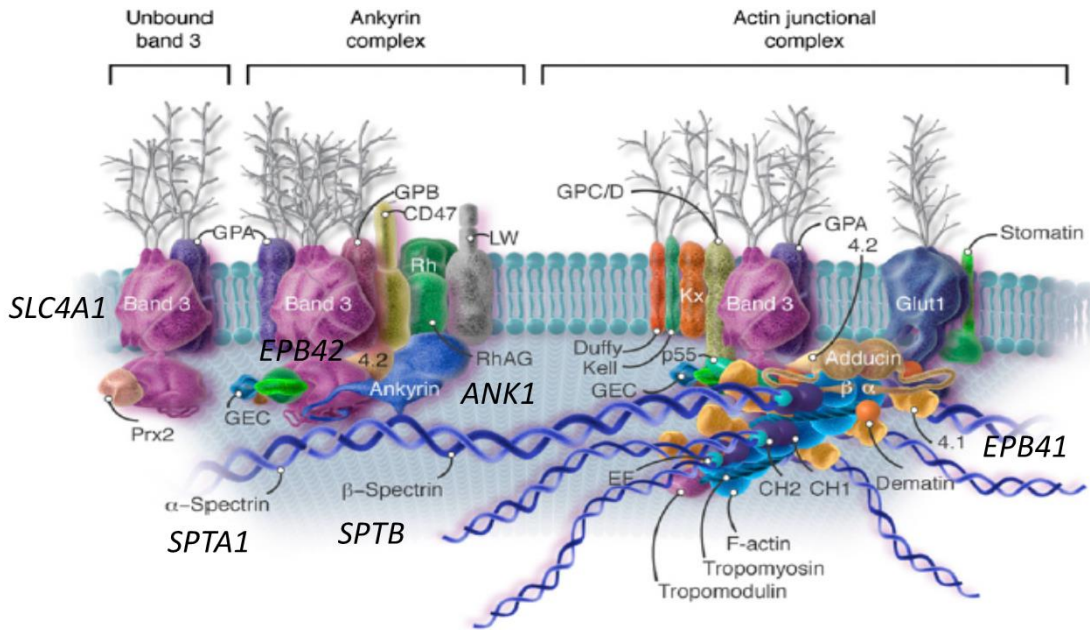
CDA = congenital dyserythropoietic anemia, SHUa = syndrome hémolytique et urémique atypique ; Hb = hémoglobine

2.2.1.1 Les pathologies de membrane du GR

Les principales pathologies de membrane du GR (Narla and Mohandas, 2017) regroupent les sphérocytoses héréditaires (SH) (Zamora and Schaefer, 2022) qui sont les plus fréquentes en Europe (jusqu'à 1 naissance sur 2000), les elliptocytoses héréditaires (Jha and Vaqar, 2022) dont les formes bénignes touchent jusqu'à une personne sur 200 dans certains pays d'Afrique, la pyropoikilocytose héréditaire qui est une forme aggravée d'elliptocytose héréditaire et la stomatocytose héréditaire déshydratée (une naissance sur 50000) ou hyperhydratée (une naissance sur un million) (Rapetti-Mauss et al., 2015; Flatt and Bruce, 2018; Jankovsky et al., 2021). Les défauts moléculaires responsables de ces pathologies sont pour la plupart clairement définis et concernent des gènes codant pour des protéines de la membrane du GR assurant le lien entre le cytosquelette et la bicouche phospholipidique ou des canaux ioniques régulant l'équilibre

hydroélectrolytique du GR (Figure 20) (Iolascon et al., 2019). La morphologie des GR sur frottis sanguin peut aider à la classification de ces pathologies sans pour autant être pathognomonique (Figure 21).

A



B



Figure 20 : Représentation schématique des principales protéines de la membrane du GR

A- Celles qui sont impliquées dans la sphérocytose héréditaire et l'elliptocytose héréditaire avec le nom des gènes en italique codant pour ces protéines. B- Schéma simplifié des principaux flux ioniques, hydriques et métaboliques impliqués dans l'hydratation du GR. Focus sur PIEZO1 et Gardos impliqués dans les stomatocytoses héréditaires déshydratées

A -Adapté de Lux 2016 (Lux, 2016) et B- Adapté de Jankovsky et al (Jankovsky et al., 2021)

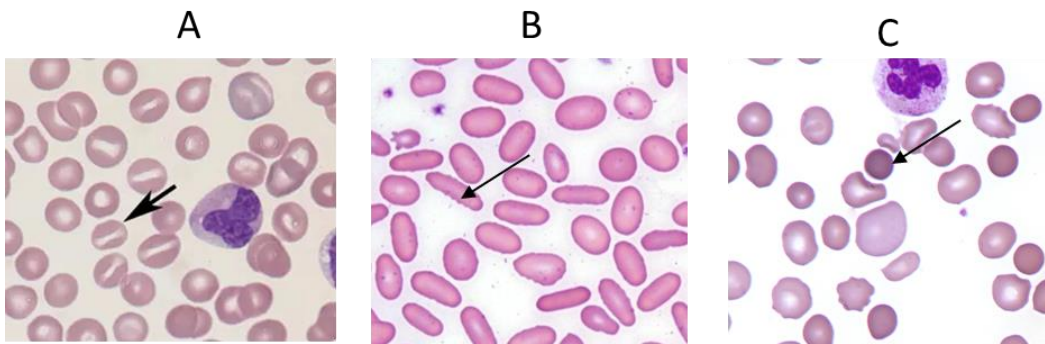


Figure 21 : Formes pathologiques de globules rouges pouvant être retrouvées dans certaines pathologies du GR

A- Stomatocytes (hematology.org) pouvant être vus dans les DHS. B- Elliptocytes (hematology.org) pouvant être vus dans les elliptocytoses héréditaires. C- Sphérocytes pouvant être vus dans les sphérocytoses héréditaires (photos issues du laboratoire d'Hématologie CHU Henri Mondor)

2.2.1.1.1 La sphérocytose héréditaire (SH)

La SH est due à des défauts quantitatifs des protéines permettant le lien entre le cytosquelette membranaire et la bicouche phospholipidique du GR. Il s'agit du réseau dit vertical des protéines de membrane du GR. Des mutations perte de fonction (non-sens, décalant le cadre de lecture, d'épissage ...) des gènes *ANK1* (ankyrine), *SPTB* (spectrine beta), *SPTA1* (spectrine alpha), *SLC4A1* (codant pour la protéine bande 3 ou échangeur anionique Cl^-/HCO_3^-), et *EPB42* (Protéine 4.2) sont retrouvées. Les modes de transmission sont multiples et dépendent du gène affecté : autosomique dominant (dans 75% des cas), autosomique récessif ou *de novo* (Figure 22). Les sphérocytoses héréditaires de transmission autosomique récessive sont dues à des mutations du gène *SPTA1* (Gallagher et al., 2019) et beaucoup plus rarement du gène *EPB42* (Bouhassira et al., 1992). La perte de surface membranaire due à ces défauts conduit à une diminution du ratio surface/volume des GR contribuant à la formation des sphérocytes. Les sphérocytes sont moins déformables et deviennent incapables de traverser les cordons spléniques où ils sont retenus et détruits. Il existe une grande variabilité phénotypique allant des formes néonatales très sévères nécessitant des transfusions à des formes se déclarant tardivement à l'âge adulte ou de découverte fortuite sur bilan biologique qui montre une hémolyse compensée. Les lithiases biliaires sont une complication fréquente de la SH et la découverte d'une splénomégalie isolée peut également conduire au diagnostic. La co-existence d'une maladie de Gilbert peut augmenter le risque de survenue de lithiases biliaires notamment en association avec des pathologies hémolytiques (Batista et al., 2021). Une surcharge en fer peut exister mais n'est pas systématique.

2.2.1.1.2 Les elliptocytoses héréditaires

Les elliptocytoses héréditaires bénignes sont dues à des variations (la plupart du temps faux-sens) des gènes *SPTB*, *SPTA1* et *EPB41* intervenant dans le réseau horizontal au niveau du

complexe jonctionnel des protéines de membrane du GR et se transmettent selon un mode autosomique dominant et plus rarement autosomique récessif pour certaines formes décrites dues à *EPB41* (Jha and Vaqar, 2022). Elles se caractérisent par la présence non systématique d'elliptocytes au frottis sanguin et d'une hémolyse de degré variable et souvent asymptomatique.

Les formes graves d'elliptocytose avec retentissement dès la naissance et transfuso-dépendance transitoire sont **les pyropoikilocytoses héréditaires** (terme proposé par (Zarkowsky et al., 1975) en rapport avec la morphologie des GR qui est identique à celle retrouvée en cas d'hémolyse chez les grands brûlés) et se transmettent selon un mode autosomique récessif. Les mutations retrouvées touchent les deux allèles du gène *SPTA1* et des cas de digénisme *SPTA1/SPTB* sont décrits (Niss et al., 2016). Des fragments d'hématies sont observés au frottis sanguin et une augmentation de la fragmentation des hématies entre 46°C et 49°C est observée alors que ces modifications morphologiques sont observées habituellement sur des GR sains au-delà de 49°C (Prchal et al., 1982).

2.2.1.1.3 L'ovalocytose du sud est asiatique (SAO)

La SAO est due à une mutation récurrente du gène *SLC4A1* codant pour la protéine bande 3 : c.1199_1225del (p.Ala400_Ala408del) et ce à l'état hétérozygote (Wrong et al., 2002). Cette variation est toujours accompagnée en *cis* par le polymorphisme dit bande 3 Memphis p.K56E du gène *SLC4A1*. La SAO est fréquente dans les pays de l'Asie du Sud-Est et du Pacifique occidental (Thaïlande, Malaisie, Indonésie, Philippines et Papouasie Nouvelle Guinée) où elle peut concerner jusqu'à 40% des populations de ces zones (BRUCE et al., 2000). Elle est très rare en Europe. Les personnes porteuses hétérozygotes SAO sont asymptomatiques. Les GR d'un sujet SAO ont perdu toute capacité de déformabilité (profil plat à l'ektacytométrie) mais ne présentent pas d'hémolyse. Ce polymorphisme a pu évoluer dans ces régions du globe à cause de la pression de sélection due à *Plasmodium falciparum* offrant ainsi une protection aux porteurs face aux formes graves cérébrales (Allen et al., 1999) comme peuvent l'être les porteurs de déficit en G6PD, de traits alpha-thalassémiques, de traits drépanocytaires, de certains variants du gène *PIEZO1* (Ma et al., 2018) et de déficit en pyruvate kinase (Williams, 2006). Des formes anormales de GR de type ovalocytes sont retrouvées au frottis. Un seul cas gravissime de patient homozygote pour la mutation SAO a été décrit à ce jour (Picard et al., 2014). La protéine bande 3 est la protéine la plus abondante de la membrane du GR et a à la fois un rôle structural et de transport ionique (échangeur $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$).

2.2.1.1.4 Les pathologies de membrane du GR dues à un défaut d'hydratation

Nous décrirons principalement les **stomatocytoses héréditaires déshydratées (DHSt) et la stomatocytose héréditaire hyperhydratée (OHSt)**.

2.2.1.1.4.1 *La stomatocytose héréditaire déshydratée*

Elle se compartimente en DHSt de type 1 due à des mutations gain de fonction hétérozygotes du gène *PIEZO1* (Andolfo et al., 2013a) et la DHSt de type 2 aussi appelée syndrome de Gardos due à des mutations gain de fonction hétérozygotes du gène *KCCN4* codant pour le canal Gardos (Gardos, 1958; Glogowska et al., 2015; Hoffman et al., 2003; Iolascon et al., 2019; Rapetti-Mauss et al., 2015). Dans les deux formes, les signes clinico-biologiques les plus fréquents au diagnostic sont l'hémolyse persistante en post-splénectomie et l'hyperferritinémie inconstamment corrélée au degré de surcharge en fer hépatique. Le spectre phénotypique des patients atteints de DHSt1 est large et va de l'hémolyse bien compensée dans la plupart des cas, à l'œdème périnatal de sévérité variable dans 20% des familles décrites et au risque accru de thromboses en post-splénectomie voire une polyglobulie vraie avec P50 diminuée (Filser et al., 2020; Frederiksen, 2019; Picard et al., 2019). La DHSt de type 2 se caractérise par une anémie hémolytique plus sévère, une surcharge en fer et une absence de signes clairs de déshydratation rapportée dans la littérature. Elle est beaucoup plus rare que la forme de type 1 avec uniquement une quinzaine de familles décrites aujourd'hui.

2.2.1.1.4.2 *La stomatocytose héréditaire hyperhydratée*

Les formes hyperhydratées de stomatocytoses héréditaires sont rarissimes (1 naissance sur 1 million) et sont dues à des mutations hétérozygotes du gène *RHAG* et sont marquées par une absence de stomatine (Andolfo et al., 2018; Bruce et al., 2009). Il existe des formes syndromiques avec manifestations neurologiques dues à des mutations bialléliques du transporteur du glucose GLUT1 (gène *SLC2A1*) et une transmission autosomique récessive.

2.2.1.1.4.3 *La cryohydrocytose et la pseudo-hyperkaliémie familiale*

Il s'agit d'une anémie hémolytique modérée due à des mutations faux sens du gène *SLC4A1* à l'état hétérozygote et caractérisée par une augmentation de la perméabilité de la membrane aux cations Na^+ et K^+ aux températures inférieures à $+4^\circ\text{C}$ (Bruce et al., 2005). La pseudo-hyperkaliémie familiale est due à des mutations du transporteur *ABCB6* à l'état hétérozygote. On observe une perte de potassium à des températures $<37^\circ\text{C}$ donc une pseudohyperkaliémie artificielle *ex vivo* quand le sang est prélevé et sorti de son environnement. Le gène *ABCB6* est aussi responsable du groupe sanguin Lan (Andolfo et al., 2013b).

Pathologie	Mode de transmission	Gène
SH de type 1	AD ou AR	<i>ANK1</i>
SH de type 2	AD	<i>SPTB</i>
SH de type 3	AR	<i>SPTA1</i>
SH de type 4	AD	<i>SLC4A1</i>
SH de type 5	AR	<i>EPB42</i>
Elliptocytose de type 1	AD ou AR	<i>EPB41</i>
Elliptocytose de type 2	AD	<i>SPTA1</i>
Elliptocytose de type 3	AD	<i>SPTB</i>
Pyropoikilocytose	AR ou digénisme	<i>SPTA1, SPTB</i>
SAO	AD	<i>SLC4A1</i>
Cryohydrocytose	AD	<i>SLC4A1</i>
Pseudo-hyperkaliémie familiale	AD	<i>ABCB6</i>

Figure 22 : Gènes impliqués dans les principales pathologies de membrane du GR et leurs modes de transmission

AD = autosomique dominant, AR = autosomique récessif

2.2.1.2 La prise en charge diagnostique des AHC et la place du SHD

Les recommandations actuellement en vigueur dans la prise en charge diagnostique des AHC datent de 2015 et placent le diagnostic génétique en dernière ligne et pour des cas limités : chez le nouveau-né, en cas de transfuso-dépendance, en cas d'associations de pathologies du GR connues, dans les cas sporadiques, pour confirmer un diagnostic de stomatocytose héréditaire déshydratée (King et al., 2015) (Figure 23). Des recommandations plus récentes (Zaninoni et al., 2018a; Kalfa, 2021) (Figure 24, Figure 25), intègrent le SHD dans la démarche diagnostique et laissent plus de place au diagnostic moléculaire. Des recommandations françaises issues du dernier PNDP Sphérocytose héréditaire et autres anémies hémolytiques par anomalies de la membrane érythrocytaire de Juillet 2021 placent encore le diagnostic génétique en dernière ligne en le limitant à des cas particuliers.

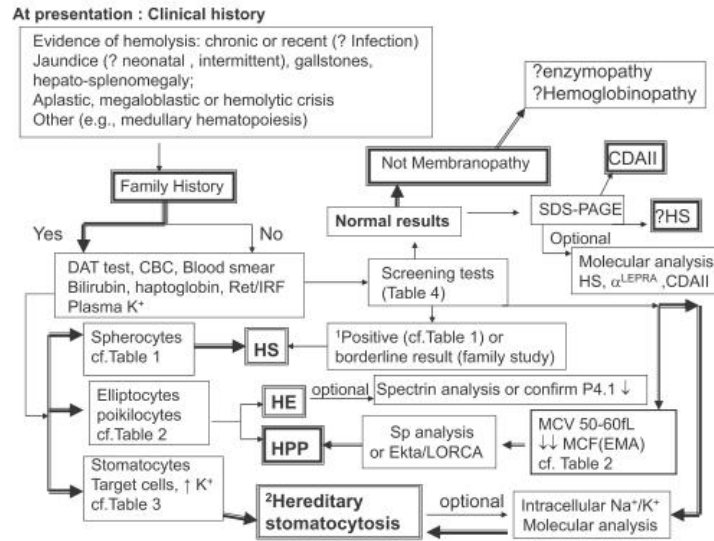


Figure 6. Diagnostic flow chart for HS, HE, and HSt. ¹Exclusion of CDAIL when test results are within in HS but the patient's clinical presentation is not typical of HS. Exclusion of hemoglobinopathy (e.g. unstable Hb) when the test result is mildly HS-like for a patient whose MCV is < 65 fL and the blood smear shows anisocytosis and poikilocytic red cells. ²: exclusion of HS.

Figure 23 : Arbre diagnostique issu des recommandations de (King et al., 2015), principalement basé sur les tests phénotypiques

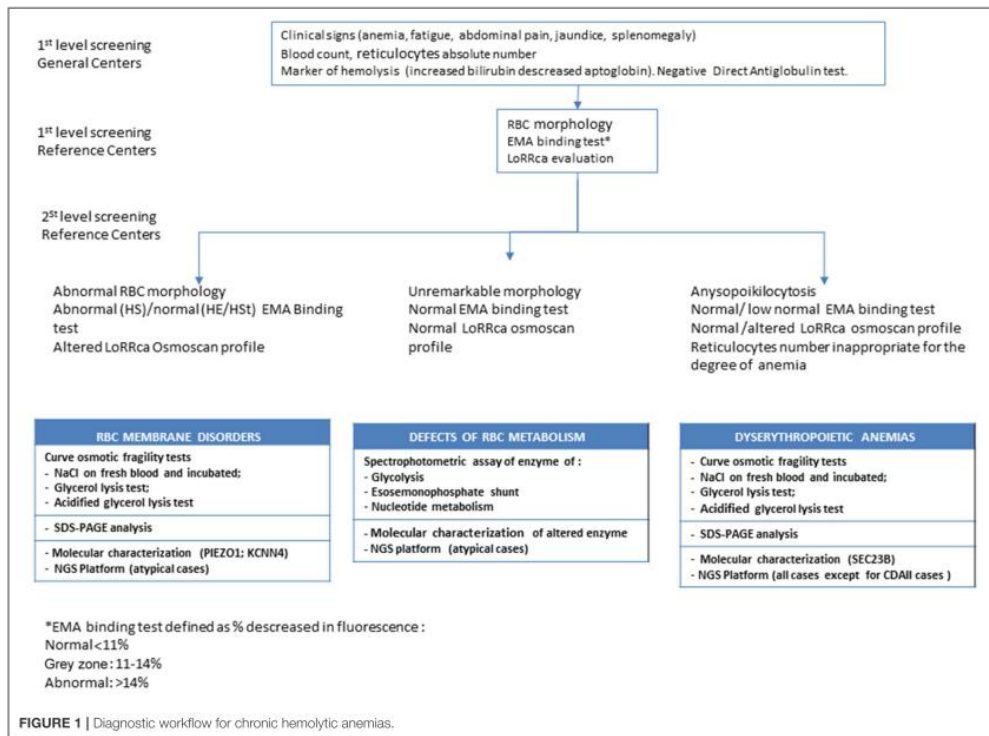


Figure 24 : Proposition d'arbre diagnostique Zaninoni et al 2018

EMA = eosine maléimide, RBC = red blood cell, HS = hereditary spherocytosis, HSt = hereditary stomatocytosis

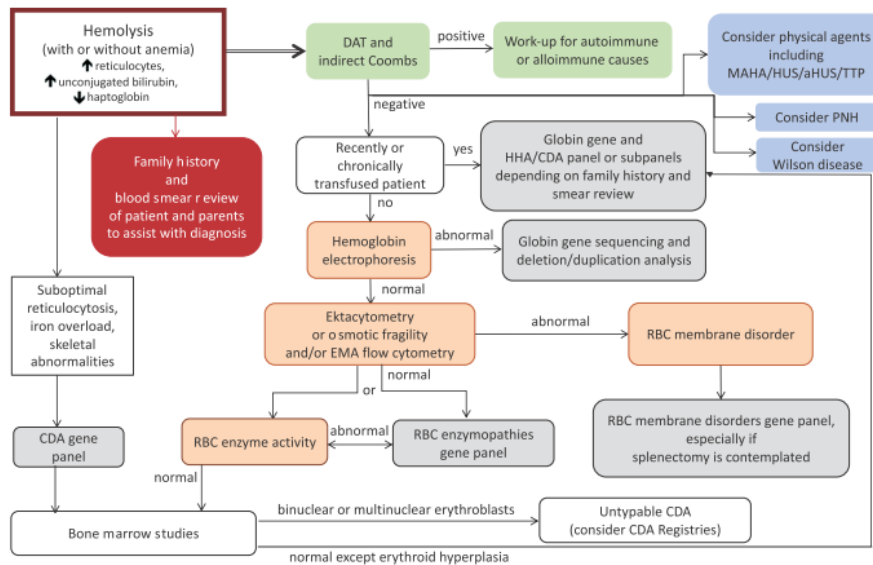


Figure 25 : Algorithme de prise en charge diagnostique des AH (Kalfa, 2021)

Les méthodes diagnostiques phénotypiques classiquement utilisées dans ces pathologies reposent sur la réalisation d'une numération de formule sanguine avec mesure du taux de réticulocytes (marqueur de régénération et de bon fonctionnement de la moëlle) accompagnée d'une lecture attentive du frottis sanguin à la recherche de formes anormales des GR (stomatocytes, elliptocytes, sphérocytes, schizocytes, fragments de GR...) qui sont non-pathognomoniques (Simionato et al., 2021b), un bilan auto-immun de type test direct à l'antiglobuline qui permet d'éliminer une cause immune de l'anémie hémolytique, un bilan biochimique exhaustif (LDH, GGT, haptoglobine, CRP, bilirubine totale, libre, mesure P50 veineuse), une étude de l'hémoglobine (chromatographie, Immunoélectrofocalisation...), une mesure des activités enzymatiques du GR, la recherche d'un clone HPN (hémoglobinurie paroxystique nocturne) par cytométrie de flux.

Les tests spécialisés de type ektacytométrie, test EMA (éosine maléimide) ou électrophorèse des protéines de membrane du GR (SDS-PAGE analysis) permettent de s'orienter vers une pathologie de membrane du GR. Le test EMA est très spécifique et sensible pour la mise en évidence d'une sphérocytose héréditaire (Girodon et al., 2008). L'ektacytométrie est un système reposant sur la mesure de la déformabilité des GR en milieu osmotique variable et a été introduit par Clark, Mohandas et Shohet en 1988 (Clark et al., 1983). Les profils obtenus dans les cas « simplex » de pathologies de membrane du GR permettent d'orienter vers telle ou telle pathologie (Da Costa et al., 2016a; Zaninoni et al., 2018b). Le SHD est considéré dans ces approches diagnostiques comme un test hautement spécialisé et n'arrive qu'en dernière ligne. Cependant, la démocratisation du SHD dans ce domaine conduit à une réflexion quant au repositionnement du diagnostic moléculaire dans ces recommandations. Plusieurs équipes pointent du doigt la

nécessité de revoir ces recommandations et de replacer le diagnostic génétique plus haut dans l'arbre diagnostique (Bianchi et al., 2020; Russo et al., 2020). Certaines remettent même en question la dénomination de ces pathologies de membrane basée sur l'aspect morphologique au frottis et suggèrent une dénomination basée sur le défaut moléculaire causal (Simionato et al., 2021b). Actuellement, deux écoles s'opposent et il n'y a pas de modifications de prise en charge diagnostique énoncée dans les dernières recommandations françaises et internationales.

Pourtant, le SHD a clairement démontré son utilité ces dix dernières années dans la prise en charge des AHC à la fois via le déploiement de panels de gènes ciblés mais aussi de l'exome et plus récemment du génome entier comme le montrent le nombre croissant de publications sur le sujet (HEREDITARY ANEMIA AND NEXT GENERATION SEQUENCING) depuis 2012 avec 192 publications (Agarwal et al., 2016; Choi et al., 2021; Dongerdiye et al., 2021a, 2021b; Fermo et al., 2021; Gholizad-Kolveiri et al., 2020; Jamwal et al., 2020; Kedar et al., 2018; Kim et al., 2017; King et al., 2015; Svidnicki et al., 2020; Tseng et al., 2019; Vives-Corrons et al., 2020).

De nouvelles recommandations tardent à éclore.

2.2.1.3 Focus sur les formes syndromiques d'AHC

Certaines anémies congénitales (hémolytiques ou non) peuvent se présenter sous forme syndromique, associées à d'autres atteintes d'organes. Les dysérythroïèses congénitales peuvent se présenter également sous forme syndromique avec des atteintes multi-organes et une anémie qui peut s'avérer hémolytique selon les cas (Iolascon et al., 2020). Les syndromes hémolytiques et urémiques atypiques en sont également un exemple avec une atteinte rénale associée à l'anémie hémolytique et la thrombopénie.

De nombreuses formes de myopathies héréditaires sont associées à une anémie hémolytique notamment celles dues à des défauts des enzymes de la glycolyse : déficit en Topoisomérase 1, déficit en phosphofructokinase (gène *PFKM*), déficit en aldolase (gène *ALDOA*), déficit en phosphoglycérate kinase 1 (gène *PGK1*) (Beecher et al., 2022).

Dans de nombreuses maladies mitochondriales l'anémie peut être un signe accompagnateur (Finsterer and Frank, 2015). L'HUPRA syndrome (Hyperuricemia, pulmonary hypertension, renal failure, and alkaline intoxication Syndrome) est un exemple d'anémie syndromique due à des mutations du gène *SARS2* entraînant un défaut de production de tRNAseryl mitochondriale spécifique (Zhou et al., 2021). La famille des N-ARS mitochondriales entraîne d'autres syndromes avec anémie comme *YARS2* codant pour la tyrosyl-tRNA synthetase 2 et impliqué dans le MLSA (Myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia) qui est une maladie syndromique mitochondriale rare. L'anémie sidéroblastique peut parfois être isolée dans ce syndrome (Riley et al., 2018).

La famille des VPS pour « Vacuolar Protein Sorting » est également impliquée dans des formes syndromiques d'anémies pouvant se présenter sous une forme hautement hémolytique et régénérative comme pour *VPS4A* (Lunati et al., 2021; Seu et al., 2020)

Pour ces formes syndromiques où la délimitation phénotypique de l'anémie n'est souvent pas claire, le recours au « Whole exome sequencing » (WES) ou « Whole genome sequencing » (WGS) est largement justifié.

2.2.1.4 Associations de plusieurs causes d'AHC ou d'AHC à d'autres pathologies génétiques

Avec l'essor du SHD de nombreux VSI émergent et les associations de VSI présents dans des gènes différents chez un même patient également. Les démonstrations fonctionnelles sont complexes à mettre en œuvre dans ces cas. Le SHD permet d'obtenir l'information de séquençage en parallèle sur de nombreux gènes impliqués dans un même sous-groupe pathologique (configuration panel) ou de tous les gènes connus via un WES ou de tout le génome d'un individu via un WGS. L'analyse n'est plus séquentielle. Les variations peuvent donc être présentes dans un même sous-groupe de gènes quand l'analyse se fait par panels ciblés (exemple anémies hémolytiques constitutionnelles) ou dans des gènes impliqués dans des pathologies totalement différentes dans le cas d'un WES ou d'un WGS effectué dans un cas syndromique où l'analyse via des mots clés phénotypiques peut amener à des découvertes incidentes ou à la découverte de la co-occurrence de deux pathologies génétiques. Les associations de plusieurs pathologies du GR sont connues et décrites depuis longtemps. Historiquement l'association d'un syndrome drépanocytaire majeur à un déficit en G6PD (Fasola et al., 2019) voire à un trait alpha-thalassémique (Santos et al., 2020) sont des associations fréquemment retrouvées et décrites. Ceci est due à la fréquence de ces variations dans certaines régions du monde et notamment leur co-localisation à des zones impaludées. La co-occurrence de deux AHC peut se voir chez un même patient et a été de plus en plus décrite ces dix dernières années au-delà des associations de type déficit en G6PD et drépanocytose ou thalassémies découvertes sur des tests phénotypiques (Minucci et al., 2015; Chen et al., 2020; Krishnevskaya et al., 2020; Russo et al., 2020; Andolfo et al., 2021; Fortugno et al., 2021). La co-occurrence de deux maladies rares chez un même individu est également décrite et rendu visible grâce au SHD de type WES ou WGS dans des cas dits syndromiques (Fernández-Marmiesse et al., 2018; Meglic et al., 2020; Song et al., 2020). Concernant les pathologies de membrane du GR les gènes *SPTA1* et *PIEZO1* sont rapportés comme les plus fréquemment co-mutés. Une explication possible est leur grande taille et l'existence d'une pathologie bénigne du GR en lien avec *SPTA1* : l'elliptocytose bénigne et l'existence d'une pathologie récessive pour *PIEZO1* (des mutations bialléliques perte de fonction de *PIEZO1* sont impliquées dans une pathologie nommée LYMPHATIC MALFORMATION 6; LMPHM6, MIM 616843) conduisant au portage asymptomatique de variants perte de fonction dans la population générale à l'état hétérozygote (Andolfo et al., 2021).

2.2.2 Les formes acquises d'anémie hémolytique

Elles constituent un diagnostic différentiel des formes constitutionnelles.

2.2.2.1 Dans le cadre des syndromes myélodysplasiques ou myéloprolifératifs

Au décours de syndromes myélodysplasiques (SMD) ou (SMP) une anémie parfois à caractère hémolytique peut apparaître. Cette cytopénie peut être isolée ou alors toucher une ou deux autres lignées hématopoïétiques. La classification des SMD de 2016 selon l'OMS ne prend pas en compte les résultats du SHD mais est basée sur les données morphologiques du myélogramme et les résultats du caryotype médullaire (Hong and He, 2017). De nouvelles entités frontières ont récemment été définies CCUS (clonal cytopenia of undetermined significance), ICUS (idiopathic cytopenia of undetermined significance) et CHIP (clonal hematopoiesis of indeterminate potential) (DeZern et al., 2019) et sont de plus en plus fréquemment retrouvées notamment chez les personnes âgées. Cette hématopoïèse clonale peut être en lien dans certains cas avec l'acquisition de mutations « driver » dans des gènes connus impliqués en onco-hématologie ou survenir en l'absence de telles mutations (Rossi et al., 2021).

Des anomalies de membrane du GR de type elliptocytose sont décrites au décours de certains SMD et peuvent mimer des elliptocytoses héréditaires apparaissant tardivement chez un individu sans antécédents personnels ou familiaux de pathologie du GR (Alanio-Bréchet et al., 2008; Manabe et al., 2021; Robier et al., 2021). Une diminution de la protéine 4.1 érythrocytaire est notée chez ces patients mais sans aucun défaut moléculaire identifié et notamment pas de mutations dans les gènes connus d'elliptocytose. La cause moléculaire initialement évoquée semblait être en rapport avec la del20q car la majorité des patients présentant l'elliptocytose acquise au décours d'un SMD avait aussi une del20q au caryotype médullaire. Mais cette anomalie chromosomique n'est ni exclusive ni pathognomonique de cette entité (Hage-Sleiman et al., 2021). Un cas de sphérocytose acquise chez un homme âgé atteint de SMD a également été décrit et le mécanisme en cause était une grande délétion chromosomique emportant le gène *SPTB* (Fraiman and Moliterno, 2015).

2.2.2.2 Dans le cadre des MAT, HPN et AHA

2.2.2.2.1 Les microangiopathies thrombotiques

La cause la plus fréquente d'anémie hémolytique acquise est la microangiopathie thrombotique ou MAT (Arnold et al., 2017). Les MAT associent une anémie hémolytique d'origine mécanique à une thrombopénie. De rares formes constitutionnelles existent (syndrome de Schullman-Upshaw dû à des mutations du gène *ADAMTS13*, à transmission autosomique récessive) mais sont la plupart du temps acquises. Elles comprennent les purpura thrombotiques thrombocytopéniques (PTT) et les syndromes hémolytiques et urémiques (SHU). Les PTT sont dus à un déficit acquis en protéine ADAMTS13 due à l'apparition d'autoanticorps anti ADAMTS13. L'anémie hémolytique apparaît suite à une destruction des GR sur les thrombi formés. Les SHU classiques surviennent le plus souvent suite à des infections de type toxiques, les SHU atypiques plus rares ont une origine génétique avec des mutations touchant les protéines de la voie du complément.

2.2.2.2 L'hémoglobinurie paroxystique nocturne ou HPN

L'HPN est une pathologie acquise liée à un défaut de certaines protéines de l'ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) : CD55 et CD59 régulant négativement l'activité du complément au niveau des GR. Leur déficit conduit à une activité non régulée du complément entraînant l'hémolyse et les autres signes cliniques. Elle survient principalement chez les hommes par mutation somatique acquise du gène *PIGA* situé sur le chromosome X. Les principaux symptômes sont l'hémolyse aigue évoluant par poussées, les accidents thrombotiques et les cytopénies périphériques pouvant aboutir à une insuffisance médullaire. Le diagnostic repose sur la cytométrie en flux avec l'utilisation de différents anticorps monoclonaux et d'un marqueur spécifique de l'ancre GPI, la fluorescéine aerolysine (FLAER) permettant de mettre en évidence l'absence ou le déficit sur au moins deux lignées cellulaires hématopoïétiques de protéines de l'ancre GPI (Brodsky, 2014; Shah and Bhatt, 2022). Le traitement repose sur l'utilisation de d'anticorps monoclonal anti fraction C5 du complément et en dernière ligne sur la greffe de moelle osseuse.

2.2.2.3 L'anémie hémolytique auto-immune ou AHAI

L'AHAI est due à la destruction par des auto-anticorps des GR entraînant une auto-hémolyse. Elle se caractérise dans 85% des cas par la positivité du test direct à l'antiglobuline (le plus souvent à IgG plus rarement à IgA ou IgM). Dans de rares cas ce test peut être négatif même en présence d'une vraie AHAI. Des sphérocytes sont présents au frottis. Son traitement repose sur l'utilisation des corticostéroïdes en première intention associée ou non au rituximab. Des immunosuppresseurs ou immunomodulateurs peuvent être utilisés en seconde ligne et enfin une splénectomie peut être réalisée selon les cas, le degré d'hémolyse et les co-morbidités (Michalak et al., 2020).

2.3 Le séquençage haut débit

2.3.1 Une brève présentation

Le séquençage dit « classique » longtemps considéré comme le « gold-standard » a été mis au point par Frédérick Sanger en 1977 à l'occasion du séquençage du génome d'un bactériophage (Sanger et al., 1977). Il est aujourd'hui supplanté par le séquençage haut débit (SHD) ou de nouvelle génération (Figure 26). Le SHD permet de séquencer des génomes humains entiers en moins de 24h et pour moins de 1000 dollars US. Les premiers séquenceurs nouvelle génération commercialisés en 2004 par la société Roche étaient basés sur la technologie du pyroséquençage : détection de l'émission de lumière due au décrochage d'un pyrophosphate à chaque ajout de nucléotide lors de la réaction de séquençage (Patrick, 2007). En 2008, le premier génome humain séquencé par SHD est publié par Wheeler D. et collaborateurs (Wheeler et al., 2008). Il aura fallu deux mois et 1,5 millions de dollars US pour l'obtenir et ce à une profondeur de lecture de 7,4X. La profondeur représente le nombre de fois où une séquence est générée et alignée de façon correcte sur le génome de référence. Elle est comptabilisée en unités « X ». Les technologies

suivantes ont développé et modifié cette technologie avec notamment l'essor de la technologie du « sequencing by synthesis » (SBS) d'Illumina, actuel leader mondial du marché des séquenceurs. Le SHD permet de séquencer en parallèle de nombreux fragments issus de la même molécule d'ADN et ce, en un temps limité autour de 24h (Figure 27 Figure 28 Figure 29). L'utilité du SHD est actuellement démontrée dans de nombreuses maladies génétiques et cette technologie est largement utilisée dans les laboratoires de diagnostic génétique partout dans le monde (Kalayinia et al., 2018), (Pecoraro et al., 2020; Pipis et al., 2019). De nombreuses applications concernent les pathologies du GR comme les hémoglobinopathies (Achour et al., 2021) et les anémies hémolytiques constitutionnelles (Bianchi et al., 2020; Fermo et al., 2021; Russo et al., 2020; Vives-Corrons et al., 2020).

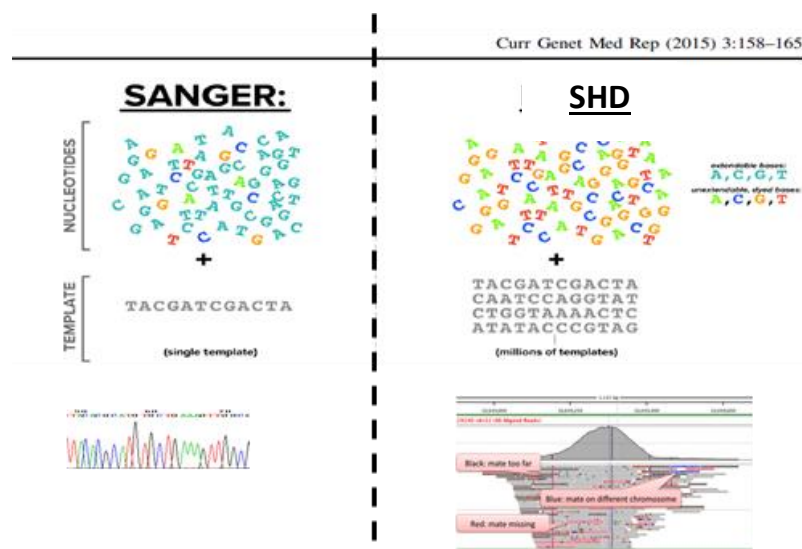


Figure 26 : Comparaison Sanger/SHD

Adapté de (Muzzey et al., 2015)

Génération de séquences appelées « reads » en SHD ou NGS à une profondeur de lecture déterminée en nombre de fois qu'une séquence est retrouvée et exprimée en nombre X.

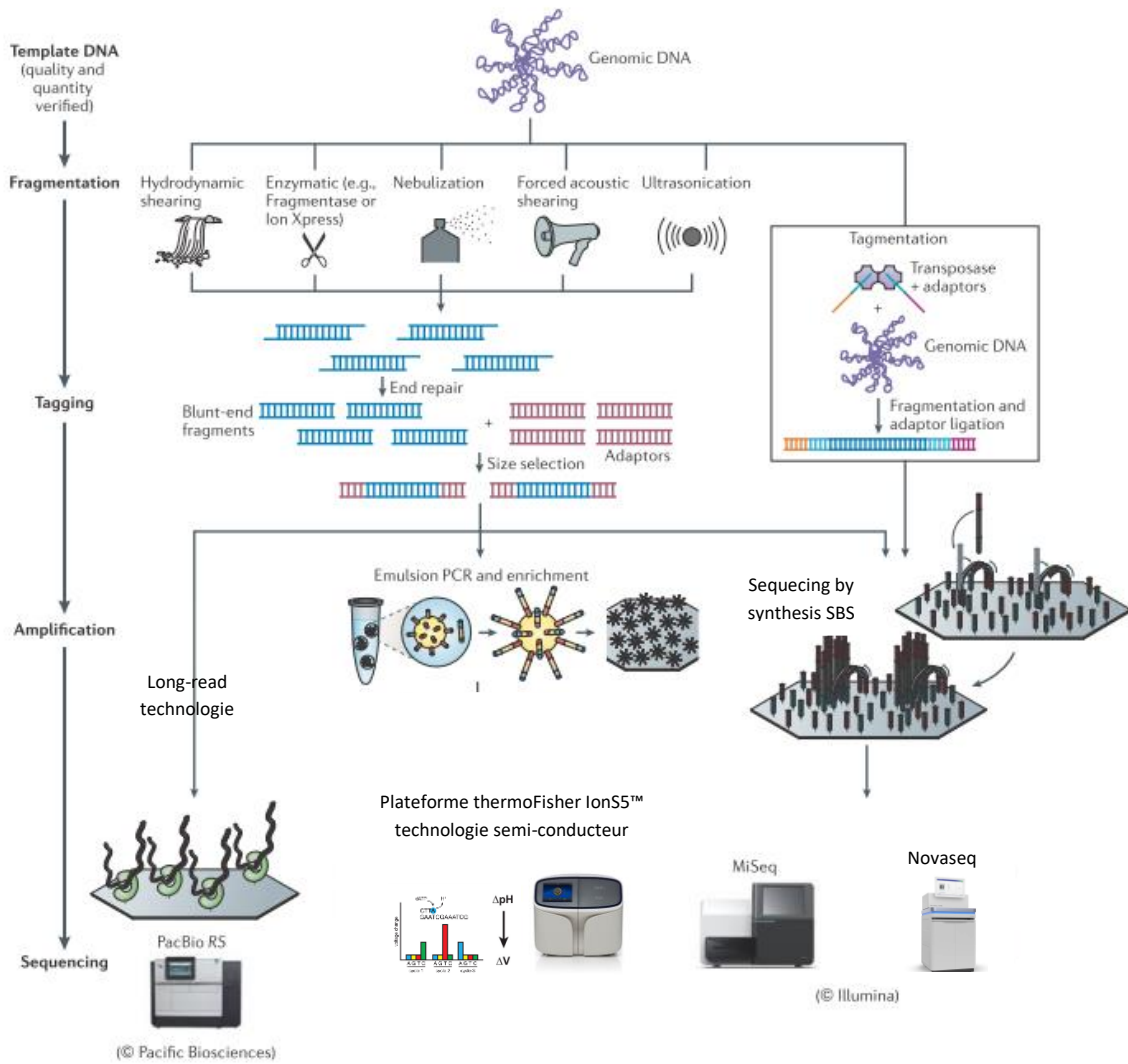


Figure 27 : Différentes plateformes de séquençage haut débit

Adapté de (Loman et al., 2012)

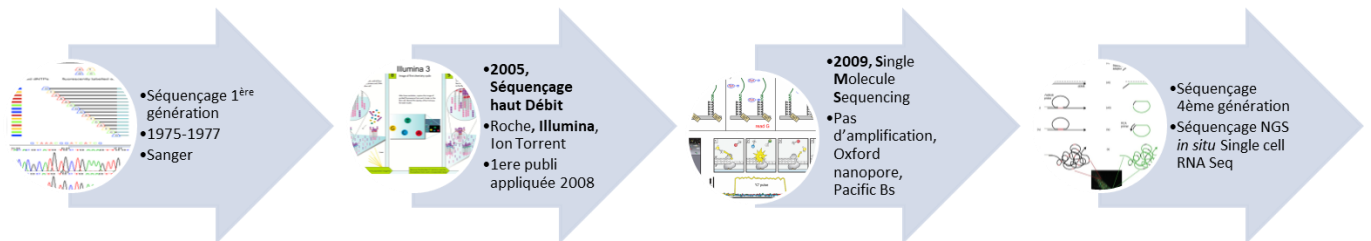


Figure 28 : Frise chronologique du séquençage

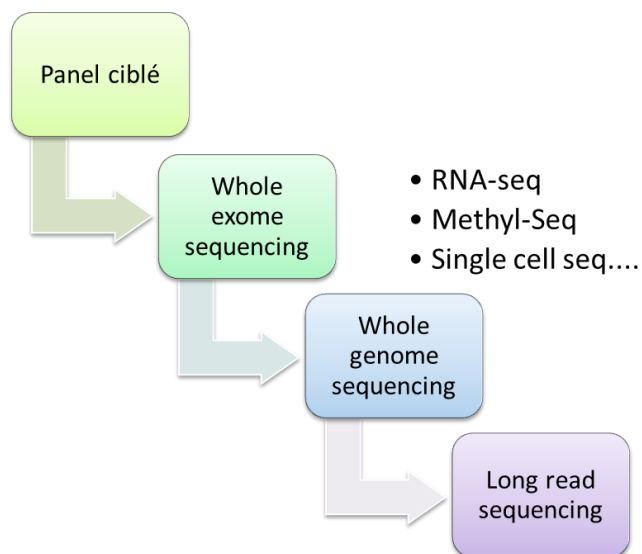


Figure 29 : « Workflow » simplifié du SHD avec les principales étapes et les applications autres que celles ADN

2.3.2 Les variations de signification incertaine VSI ou VUS (variant of uncertain significance)

Le terme de VUS ou VSI en français a été introduit et défini en 2015 par Richards et collaborateurs sous l'égide de l'American College of Medical genetics (; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee et al., 2015). Cette publication présente des recommandations et des critères gradués pour la classification des variations de séquence identifiées dans les laboratoires de génétique. Cinq classes sont ainsi proposées : bénigne, probablement bénigne, de signification incertaine, probablement pathogène, pathogène. Les critères sont définis en critères « P » comme pathogène et « B » comme bénin et sont fondés sur la fréquence du variant dans la population générale (bases de données type gnomAD, ClinVar, 1000 génomes...), les prédictions *in silico* des outils bioinformatiques, les études familiales et les tests fonctionnels. Il existe de nombreux outils en ligne permettant d'effectuer cette classification en cochant les différents critères retenus : Genetic Variant Interpretation Tool | University of Maryland School of Medicine (umaryland.edu)., Franklin (genoox.com), Alamut (Sophia genetic)... (Figure 30).

Pathogenic	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Very strong (PVS1) AND <ul style="list-style-type: none"> (a) ≥ 1 Strong (PS1–PS4) OR (b) ≥ 2 Moderate (PM1–PM6) OR (c) 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 supporting (PP1–PP5) OR (d) ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) (ii) ≥ 2 Strong (PS1–PS4) OR (iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND <ul style="list-style-type: none"> (a) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR (b) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) OR (c) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Likely pathogenic	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Very strong (PVS1) AND 1 moderate (PM1–PM6) OR (ii) 1 Strong (PS1–PS4) AND 1–2 moderate (PM1–PM6) OR (iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR (iv) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR (v) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR (vi) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Benign	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Stand-alone (BA1) OR (ii) ≥ 2 Strong (BS1–BS4)
Likely benign	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Strong (BS1–BS4) and 1 supporting (BP1–BP7) OR (ii) ≥ 2 Supporting (BP1–BP7)
Uncertain significance	<ul style="list-style-type: none"> (i) Other criteria shown above are not met OR (ii) the criteria for benign and pathogenic are contradictory

Figure 30 : Critères de classification ACMG

PS = pathogenic strong, PVS= pathogenic very strong, PM = pathogenic moderate, PP = pathogenic supporting, BS = benign strong, BA= benign stand alone, BP = benign supporting, Adapté de (; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee et al., 2015)

Une classification revue des critères de l'ACMG a été publiée en 2017 dans la revue Nature (Nykamp et al., 2017) et porte le nom de Sherloc (semiquantitative, hierarchical evidence-based rules for locus interpretation) (Figure 31).

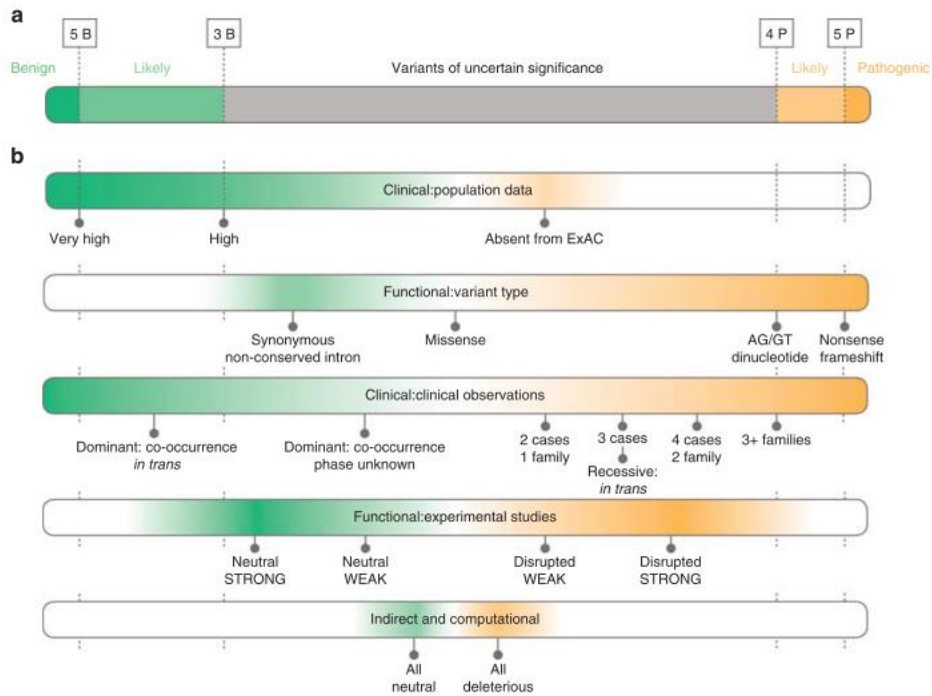


Figure 31 : Classification revue de l'ACMG : Sherlock

Adapté de (Nykamp et al., 2017)

Le SHD a contribué à la multiplication exponentielle des VSI, rendant la nécessité de reclassification indispensable ces dernières années. Les technologies de type WES ou WGS dont l'usage s'est largement étendu ces dix dernières années contribuent à alimenter l'afflux de VSI. Une simple recherche bibliographique sur le moteur de recherche Pubmed nous permet de trouver 3727 entrées de 2012 à 2022 correspondant au terme « variant of uncertain significance » et 531 avec les termes « Next generation sequencing AND variant of uncertain significance » sur la même période avec une croissance exponentielle (Figure 32).

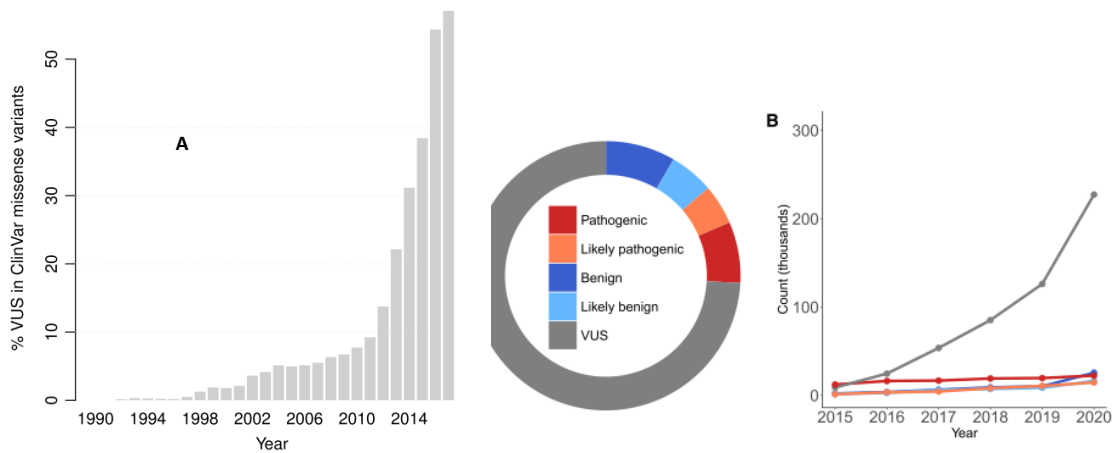


Figure 32 : Place des VSI dans la base de données Clinvar

Adapté de (Weile and Roth, 2018) et (Fayer et al., 2021)

A-Pourcentage des VSI parmi les variations faux sens répertoriées dans Clinvar de 1990 à 2017. B- Répartition des différentes classes de variations dans Clinvar de 2015 à 2020 et évolution de leur nombre par catégorie sur la même période.

Le titre d'une publication récente sur le sujet résume l'immensité du problème soulevé à la fois au niveau des laboratoires et des praticiens effectuant l'interprétation des variants mais aussi des cliniciens recevant les résultats de génétique et se retrouvant face aux patients au moment du rendu : « The scary world of variants of uncertain significance... » (Sullivan, 2020). Une autre publication de sciences humaines et sociales traite le problème sur le versant « patient » et sur comment ces VSI sont perçus par les patients au moment du rendu de résultat (Clift et al., 2020).

Il n'est pas exagéré de penser que la validation fonctionnelle de ces VSI deviendra dans les prochaines années un enjeu de santé publique à l'ère du tout génome et du déploiement des plans nationaux génomes comme le plan France médecine génomique 2025. La reclassification de ces variants est indispensable à l'aboutissement d'un diagnostic et d'un conseil génétique. En France, des plateformes de génomique fonctionnelle permettant de valider expérimentalement l'effet de ces VSI n'existent pas encore mais leur construction est en cours de réflexion. Une mutualisation des moyens humains et financiers est nécessaire afin d'aboutir à des réponses dans des délais acceptables.

2.3.3 Les outils d'interprétation des VSI

Ces outils se basent sur les critères de classification de l'ACMG : la fréquence dans les bases de données de variations, les études *in silico* utilisant des logiciels de prédiction de pathogénicité de variants, l'étude de la ségrégation familiale du variant et les analyses fonctionnelles. Les bases de données de variations interrogées sont principalement gnomAD <https://gnomad.broadinstitute.org/> (données de séquençage de 125748 exomes et de 15708 génomes issus de sujets non apparentés et affiliés à des cohortes pathologies-spécifiques ou issus de la population générale saine), ClinVar <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar> base de données

concernant la classification du variant et le phénotype associé, OMIM <http://www.omim.org>, base de données des gènes humains impliqués en pathologie avec les mutations connues et les références, HGMD = Human Gene Mutation Database <http://www.hgmd.org> base de données de variants annotés et publiés dans la littérature.

Les outils de prédiction bioinformatiques de pathogénicité de variants sont très nombreux et en constante évolution. Beaucoup de ces outils sont basés sur des algorithmes de conservation de séquences inter-espèces comme Polyphen-2 (Adzhubei et al., 2013) et SIFT (Ng and Henikoff, 2001). De nombreuses combinaisons d'outils définissant des scores ont vu le jour : GERP, CADD, Polygenic score, Bayesdel... (Figure 33). Parfois utilisés seuls ou en association ces outils permettent une aide à la classification des VSI (Smol et al., 2022).

Table 2 In silico predictive algorithms

Category	Name	Website	Basis
Missense prediction	ConSurf	http://consurf.tau.ac.il	Evolutionary conservation
	FATHMM	http://fathmm.biocompute.org.uk	Evolutionary conservation
	MutationAssessor	http://mutationassessor.org	Evolutionary conservation
	PANTHER	http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreform.jsp	Evolutionary conservation
	PhD-SNP	http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html	Evolutionary conservation
	SIFT	http://sift.jcvi.org	Evolutionary conservation
	SNPs&GO	http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go	Protein structure/function
	Align GVGD	http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php	Protein structure/function and evolutionary conservation
	MAPP	http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/MAPP/index.html	Protein structure/function and evolutionary conservation
	MutationTaster	http://www.mutationtaster.org	Protein structure/function and evolutionary conservation
	MutPred	http://mutpred.mutdb.org	Protein structure/function and evolutionary conservation
	PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2	Protein structure/function and evolutionary conservation
	PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php	Alignment and measurement of similarity between variant sequence and protein sequence homolog
	nsSNPAnalyzer	http://snpanalyzer.uthsc.edu	Multiple sequence alignment and protein structure analysis
	Condel	http://bg.upf.edu/fannsd/	Combines SIFT, PolyPhen-2, and MutationAssessor
CADD	http://cadd.gs.washington.edu	Contrasts annotations of fixed/nearly fixed derived alleles in humans with simulated variants	
Splice site prediction	GeneSplicer	http://www.cccb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml	Markov models
	Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF/	Position-dependent logic
	MaxEntScan	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scores.html	Maximum entropy principle
	NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2	Neural networks
	NNSplice	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html	Neural networks
FSPLICE	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fsplc&group=programs&subgroup=gfind	Species-specific predictor for splice sites based on weight matrices model	
Nucleotide conservation prediction	GERP	http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html	Genomic evolutionary rate profiling
	PhastCons	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/	Conservation scoring and identification of conserved elements
	PhyloP	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/	Conservation scoring and identification of conserved elements
		http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/help-pages/phyloP.txt	Alignment and phylogenetic trees: Computation of P values for conservation or acceleration, either lineage-specific or across all branches

In silico tools/software prediction programs used for sequence variant interpretation.

Figure 33 : Exemples d'outils de prédiction bioinformatique

Adapté de (; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee et al., 2015)

Aucun outil n'est parfait et ce n'est que la concordance de plusieurs faisceaux d'arguments qui est utile. Par ailleurs une connaissance même succincte de la façon dont ces outils fonctionnent

est nécessaire pour l'utilisateur afin de conserver un esprit critique face aux prédictions (Borges et al., 2021; Bris et al., 2018; Campuzano et al., 2020; Favalli et al., 2021; Fayer et al., 2021; Frazer et al., 2021; Petrosino et al., 2021; Ranganathan Ganakammal and Alexov, 2020; Smol et al., 2022; Uribe et al., 2021).

Au niveau expérimental, de nombreuses technologies existent afin de valider l'effet délétère d'une variation (Kanavy et al., 2019). Des recommandations concernant le critère de caractérisation fonctionnelle des variants selon la classification de l'ACMG ont été publiées en 2019 et proposent une marche à suivre afin de mettre en place ces tests fonctionnels (Brnich et al., 2019). Les modèles animaux et cellulaires sont les plus anciens et probablement les plus utilisés bien que les modèles animaux soient de moins en moins valorisés et ce, dans une démarche globale de protection animale mais également parce qu'il sont souvent très loin de la physiologie humaine (Mckean et al., 2021). Les modèles cellulaires sont à définir avec soin en fonction du gène muté et de son expression notamment. Il existe de nombreux exemples dans différentes maladies génétiques comme les maladies neurologiques (Yao et al., 2022). Les modèles IPS (induced pluripotent stem cells) ont le « vent en poupe » mais demeurent du domaine de l'expertise de quelques plateformes très spécialisées. La technologie CRISPR/Cas9 utilisée pour la mutagenèse dirigée détient aujourd'hui la palme des techniques de mutagenèse dirigée de part la grande palette d'applications et de possibilités de l'outil (Doudna and Charpentier, 2014). L'association CRISPR/CAS9 et IPS (Lin et al., 2021; Mullin et al., 2021) est une approche fonctionnelle avec de nombreuses applications en génétique humaine (Fuster-García et al., 2020; H. Guo et al., 2021). Les études de type métabolomique (Alaimo et al., 2020), lipidomique, protéomique et transcriptomique permettent également d'étudier l'impact d'une variation sur les différents aspects du métabolisme cellulaire. Au niveau des OMICS le plus fréquemment utilisé est la transcriptomique pour étudier l'effet d'une variation sur l'épissage et le niveau de transcription que ce soit par du SHD via du RNA seq ou par des études plus classiques type séquençage Sanger et RT-Q-PCR sur du cDNA ou des tests de type mini-gènes (Splicing and disease working group et al., 2020; Valenzuela-Palomo et al., 2022).

Dans ce domaine de la science, une technologie d'avant-garde semble prometteuse pour la validation fonctionnelle des nombreux VSI générés par le SHD. Il s'agit initialement des techniques dites de DMS pour « deep mutational scanning » (Fowler et al., 2010) rebaptisée MAVE pour « Multiplexed assays of variant effects » (Gasperini et al., 2016; Starita et al., 2017; Weile and Roth, 2018; Gelman et al., 2019; Da Kuang et al., 2021; Jia et al., 2021; Nielsen et al., 2021). Cette technologie se décline en six étapes : la mutagenèse ; la génération d'une banque (library) de variants; la sélection des variants fonctionnellement actifs; la lecture et l'analyse des résultats sélectionnés permettant de générer une carte séquence/fonctions ; l'analyse informatique pour identifier les valeurs manquantes et affiner l'analyse via une « machine learning ». Il s'agit d'une analyse concomitante de plusieurs milliers de VSI dans un même modèle cellulaire (Figure 34).

Les principaux modèles utilisés sont la levure, les cellules HEK293T, HeLa ou HAP1. Les données générées sont de type SHD et permettent de mesurer notamment l'expression du gène ciblé. Les données sont traitées par des approches de type « machine learning » afin d'intégrer tous les résultats des tests. L'objectif serait de créer un atlas fonctionnel de toutes les variations ponctuelles possibles pouvant exister à l'échelle de l'ensemble des gènes connus dans un premier temps puis dans une mesure plus ambitieuse de toutes les régions du génome humain. De telles études ont été déjà réalisées en oncologie (Starita et al., 2017; Fayer et al., 2021; Jia et al., 2021) (Figure 34).

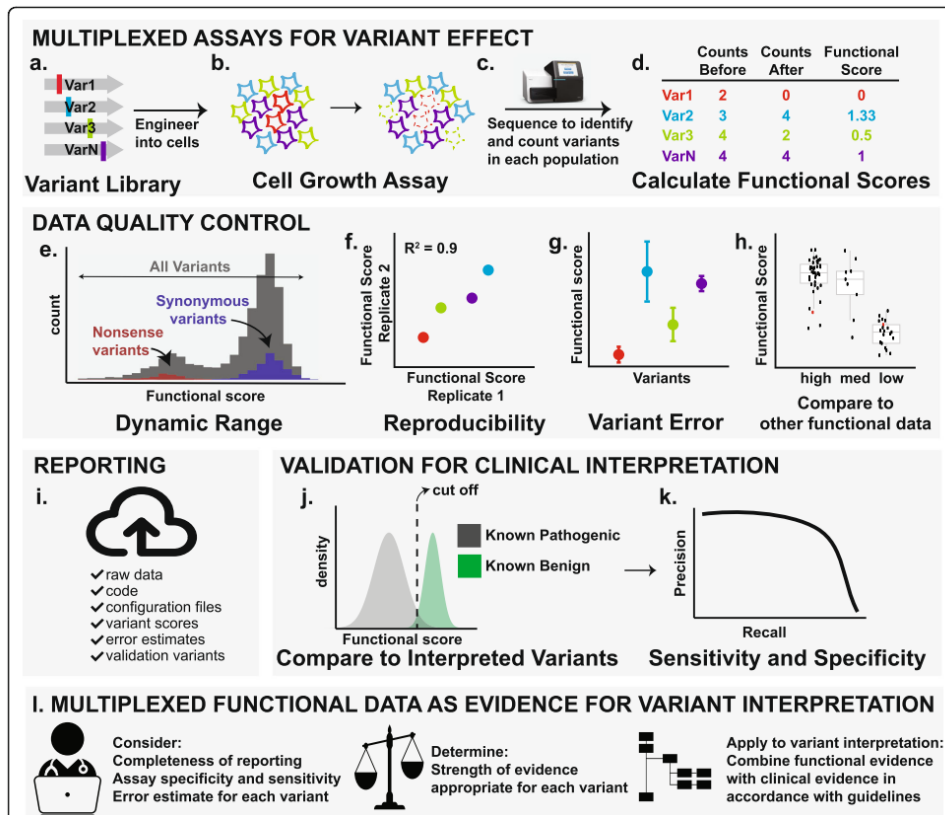


Figure 34 : Etapes nécessaires pour produire, valider et utiliser les données d'une MAVE

Adapté de (Gelman et al., 2019)

Des contrôles positifs connus pour être pathogènes sont intégrés (en rouge) et des témoins normaux également en bleu. Il faut au moins réaliser la manipulation deux fois. Les variants de chaque population cellulaire sont séquencés et des scores fonctionnels liés à leur fréquence dans le run sont calculés pour chaque variant.

Les mesures d'activités enzymatiques avec des tests biochimiques sont décrites pour de nombreuses maladies génétiques et sont très utiles pour définir l'impact fonctionnel de variants touchant des enzymes (Himmelreich et al., 2018; van de Stadt et al., 2021).

L'étude de la ségrégation familiale du variant fait partie des critères de l'ACMG et de nombreuses études familiales avec corrélation génotype/phénotype sont publiées (Lovato et al., 2019; Min et al., 2022). L'étude de la ségrégation familiale du variant dans une maladie à pénétrance complète

est un outil puissant à condition de disposer de suffisamment d'individus atteints et sains et du phénotype en regard de la génétique. Cet outil demeure souvent complexe à mettre en place du fait de la non disponibilité des apparentés et de l'absence de moyens humains pour la mettre en place (exemple : reconvoication des patients et des apparentés nécessite une personne avec du temps dédié).

Il existe des documents d'aide à la classification des variants gènes spécifiques disponibles sur le site ClinGen ([Evidence Repository - Clinical Genome Resources](#)). Pour le moment seuls quelques gènes sont représentés et notamment ceux qualifiés d'actionnables et donc majoritairement en lien avec l'oncologie. Aucun gène impliqué dans une pathologie héréditaire du GR n'est représenté. Dans le monde du GR, la grande accessibilité de l'organe atteint = le sang et la très grande quantité du substrat = GR offre un large champ de possibilités fonctionnelles. Cependant l'absence de noyau et d'organites du GR peut complexifier certaines approches. Les techniques utilisées dans le monde du GR pour déterminer l'effet d'un VSI *in vitro* sont les mêmes que celles présentées ci-avant. Certaines mesures spécifiques au GR peuvent néanmoins être relevées comme :

- la mesure des activités enzymatiques du métabolisme du GR permet de déterminer l'impact d'un VSI retrouvé dans un des gènes codant pour une de ces enzymes comme *G6PD*, *PKLR*, *TPI*...
- les techniques d'étude spécialisées de l'hémoglobine qui permettent de mettre en évidence certains variants de l'Hb en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (Wajcman et al., 2002; Zanella-Cleon et al., 2009)
- les techniques d'étude des propriétés de la membrane comme l'ektacytométrie, le test en cytométrie de flux à l'éosine maléimide (dont certaines seront détaillées dans la partie Matériel et méthodes de ce travail) permettant quant à elles d'aider à la classification de VSI retrouvés dans des gènes codant pour des protéines de membrane du GR et impliqués dans des pathologies comme la sphérocytose héréditaire ou la stomatocytose héréditaire.
- les techniques d'électrophysiologie non spécifiques comme le patch-clamp (Petkova-Kirova et al., 2019) qui mesure des courants au niveau de la membrane du GR permettant d'étudier la fonction de certains canaux ioniques comme le canal PIEZO1 ou la technique Macey-Bennekou-Egée dite du CCCP (Macey et al., 1978; Bennekou, 1988; Monedero Alonso et al., 2021; Jansen et al., 2021)
- la culture de progéniteurs érythroïdes à partir de cellules CD34+ sélectionnées à partir de la moelle osseuse ou du sang périphérique des patients peut aider à mieux refléter la réalité physiologique érythroïde (Fibach et al., 1991; Filippone et al., 2010). L'extraction d'ADN à partir de ces précurseurs permettrait par exemple d'étudier sur un meilleur modèle le biais d'inactivation de l'X chez certains patients porteurs de VSI dans un gène situé sur l'X

- les études de protéomique spécifiques du GR mature et du réticulocyte offrent un catalogue de protéines présentes dans le GR permettant de cibler certains gènes comme des candidats de certaines pathologies (Gautier et al., 2018) et pourraient permettre si développées dans ce sens de valider fonctionnellement l'effet de VSI sur l'expression de la protéine.

L'un des intérêts majeur de reclassifier ces VSI est la possibilité *in fine* de confirmer un diagnostic génétique mettant ainsi fin à une errance diagnostique, de pouvoir offrir d'éventuelles nouvelles orientations thérapeutiques innovantes ou non et un conseil génétique.

3 Matériel et Méthodes

3.1 Objectifs et Stratégie proposés

Les objectifs de ce travail sont de mieux comprendre l'effet de VSI identifiés en SHD. La stratégie proposée repose sur la mise en place d'approches fonctionnelles locales abordables comme des réorientations de techniques phénotypiques déjà utilisées en routine diagnostique (comme la courbe de densité des GR), de nouvelles techniques utilisées dans le cadre de la recherche (LORRCA) et le développement d'axes collaboratifs. Cette approche avant tout pragmatique vise à utiliser des ressources locales et extérieures. Ce travail nous a permis de mieux appréhender les avantages et les difficultés posées par la validation fonctionnelle des VSI générés par le SHD et ce dans l'attente de la mise en place de plateformes de génomique fonctionnelle dédiées.

Un système de re-convocation de patients déjà explorés en SHD pour leur anémie constitutionnelle ou hémolyse inexpliquée (patients chez lesquels ont déjà été exclus les diagnostics suivants : HPN, AHAI, SHU) et chez lesquels un ou plusieurs VSI ont été identifiés a pu être mis en place avec l'aide d'une infirmière coordinatrice de soins. Des examens complémentaires leur ont été proposés à l'Unité des maladies génétiques du globule rouge de l'Hôpital Henri Mondor. Un formulaire de non-opposition dédié leur a été proposé à la signature. Une liste d'examens à réaliser a été mise en place (Figure 35).

Les paramètres biologiques étudiés sont les suivants : Numération et formule sanguine, frottis, bilan d'hémolyse avec mesure taux de réticulocytes, haptoglobine, LDH, bilirubine, bilan martial dont récepteur soluble de la transferrine et imagerie quand possible, étude de transcrits sur tube Paxgene, étude de la déformabilité par LORRCA, mesure de la densité des GR, mesure des activités enzymatiques du GR, mesure de la P50 sur gaz du sang veineux, étude de l'hémoglobine.

PROCOLE SHD AHC

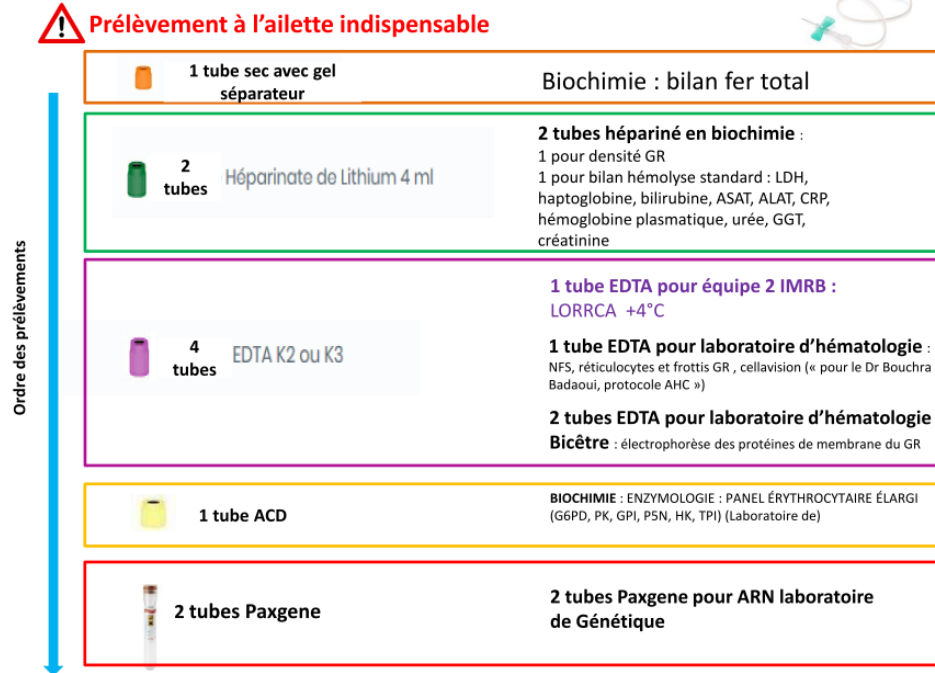


Figure 35 : Stratégie d'examens complémentaires

3.2 Patients

Les patients inclus pour étude en SHD de leur pathologie du GR sont discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) GR zone Nord de la filière de soin MCGRE (maladies constitutionnelles du globule rouge et de l'érythropoïèse) avant inclusion. Les résultats obtenus sont également discutés en RCP. Ils ont tous signé un consentement pour étude génétique et recherche. Suite au rendu de leur résultat d'étude génétique, 33 cas index ont pu être reconvoqués grâce à l'infirmière de coordination du service des maladies génétiques du GR de l'Hôpital Henri Mondor.

3.3 Extraction ADN

L'ADN a été extrait des cellules nucléées du sang total prélevé sur tube EDTA par technique Flexigene (Qiagen®) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN du sang total a également été extrait par technique semi-automatisée Maxwell RSC en kit Whole blood. L'ADN a été extrait de bulbes capillaires via un kit « Maxwell RSC tissue ». L'automate et les kits ont été utilisés selon les recommandations du fournisseur (Promega®). L'extraction des biopsies de peau a été réalisée avec un kit minikit Qiagen selon les recommandations du fournisseur ou via le kit Maxwell RSC Tissue.

3.4 Séquençage haut débit et analyse bioinformatique

Les analyses exomiques ont été réalisées avec la technologie de capture Medexome Roche Nimblegen à partir d'ADN extrait de sang total et les manipulations réalisées selon les recommandations du fournisseur. La banque ainsi préparée a été séquencée sur un Nextseq500 Illumina en technologie Highoutput.

Les panels ciblés (membrane et dysérythropoïèse, Annexe 1 - Liste gènes panel membrane et CDA) ont été réalisés par capture ciblée Kapa hyperchoice max Roche® selon les recommandations du fournisseur. Les bibliothèques ainsi générées ont été séquencées sur Miseq Illumina en 2*300 cycles en « paired-end ».

Les données de séquençage sont par la suite démultiplexées avec bcltofastq2 quand elles sont issues du nextseq500 ; l'analyse des fastq se fait via un pipeline bioinformatique local « SMAUG » et sur le logiciel seqnext (JSI) pour les données du panel ciblé « DY_POL_MEM ».

A partir de fichiers .fastq ou .bcl selon le séquenceur utilisé, le pipeline local SMAUG génère des fichiers .bam et .vcf qui sont visualisés sur Alamut (Sophia Genetic®) pour les .vcf. Les données issues de l'exome sont analysées sur une liste de gènes impliqués dans les anémies hémolytiques constitutionnelles (Annexe 2- Liste gènes panel AHC v1). Les variants ont été filtrés puis analysés selon les critères définis dans (Mansour-Hendili et al., 2020).

Concernant l'analyse de type génome entier, celle-ci a été réalisée dans le cadre du Plan France Médecine génomique 2025 (Annexe 3 - Matériel et méthodes Génome Sequoia). Le Plan France médecine génomique est un plan national de valorisation et de développement de la médecine génomique dans un but de soin. Les patients souffrant de maladies rares en impasse diagnostique peuvent bénéficier via les deux plateformes nationales de séquençage très haut débit (Sequoia Zone Nord et AURAGEN Zone Sud) d'analyses génétiques de type génome entier. Les maladies constitutionnelles du GR via la pré-indication « maladies constitutionnelles du globule rouge » rentrent dans le cadre du PFMG2025.

3.5 LORRCA

Le LORRCA ou Laser Optical Rotational Red Cell Analyzer (Zaidi et al., 2020) est un appareil développé par la société Mechatronics™. Il s'agit d'un ektacytomètre de nouvelle génération permettant d'étudier les propriétés de la membrane du GR. Le principe de l'ektacytométrie est basé sur la mesure de la diffraction d'un faisceau laser à travers une fine couche de globules rouges soumise à une force constante (Mohandas et al., 1980). Le LORRCA comprend différents modes d'analyses. Le mode osmoscan permet d'étudier la déformabilité à contrainte de cisaillement constante = *shear stress* (30 Pa) avec un gradient osmotique modulable. L'ektacytomètre se compose d'un laser permettant d'étudier la diffraction à travers le milieu composé de sang dilué dans du polyvinylpyrrolidone (PVP) et en appliquant une force de cisaillement constante de 30 Pa à une température constante de 37 °C entre le « bob » et la

« cup » (Figure 36, (Rab et al., 2019)). La courbe représentant l'index d'élongation (EI) en fonction de l'osmolarité est appelée osmoscan (Figure 37). L'osmoscan fournit des informations à la fois sur la déformabilité cellulaire mais aussi sur la rigidité membranaire (Da Costa et al., 2016a). Chez un sujet sain, à l'osmolarité physiologique, on a la déformabilité maximum (EImax). Le paramètre Omin correspond à l'osmolarité où la moitié des globules rouges sont hémolysés, ce paramètre reflète la résistance osmotique du GR. L'index d'élongation (EI = elongation index) est calculé avec la hauteur (a) et la largeur (b) du modèle de diffraction (Figure 37, <https://rrmechatronics.com/product/rbc-2/lorrca/>). Le paramètre EImax correspond au maximum d'index d'élongation et est un reflet de la surface/volume membranaire. En milieu hypoosmolaire le globule rouge gonfle jusqu'à atteindre son maximum de résistance à l'hypoosmolarité. Si on continue à diminuer l'osmolarité en dessous de Omin on va jusqu'à la lyse complète de la cellule. En sens inverse, quand l'osmolarité augmente on observe une déshydratation du globule rouge avec une diminution de sa déformabilité (Clark et al., 1983). Le paramètre Ohyper permet ainsi d'appréhender l'état d'hydratation du GR et est inversement corrélé à la CCMH. Le point Ohyper correspond à l'osmolarité pour laquelle on obtient 50% de la déformabilité maximale des globules rouges en zone hyperosmolaire. Un décalage de ce point vers la droite reflète une viscosité cytoplasmique diminuée et une augmentation du volume cellulaire, c'est-à-dire une diminution de la CCMH (Clark et al., 1983). L'aire sous la courbe est un paramètre permettant d'appréhender la surface cellulaire.

Des valeurs normales ont été définies sur 17 sujets sains (Tableau 1).

Omin	[127,26;152,85]
Ohyper	[422,27;486,67]
Aire	[168,06;184,51]
Eimax	[0,6117;0,6253]

Tableau 1: Normes osmoscan sur 17 témoins

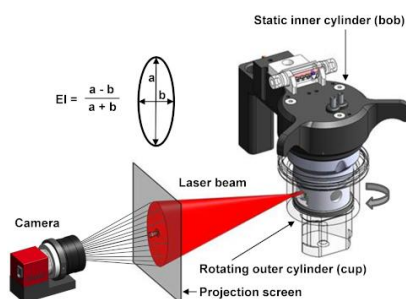


Figure 36 : Schéma du « bob » et de la « cup » du LORRCA

Adapté de [Lorrca – Functional RBC Analysis – Lorrca – Red Blood Cell Analyzer \(https://lorrca.com\)](https://lorrca.com)

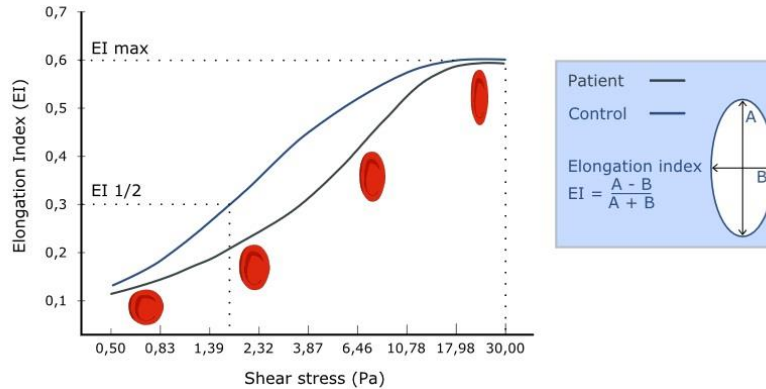


Figure 37 : Courbe de déformabilité LORRCA

Adapté de Lorrca – Functional RBC Analysis – Lorrca – Red Blood Cell Analyzer (<https://lorrca.com>)

3.6 Courbe de densité des GR par gradient de phtalates

Décrite initialement par Danon D. et Marikovsky en 1964, (Danon and Marikovsky, 1964) la technique de mesure de la densité des GR en gradient de phtalates a été remise au goût du jour par Bartolucci et collaborateurs en 2012 (Bartolucci et al., 2012b) avec comme application principale la mesure des taux de cellules denses chez les patients souffrant de syndromes drépanocytaires majeurs. Deux esters de phtalates différents sont mélangés (n-butyl phtalate et diméthylphtalate) afin d’obtenir un mélange d’huiles de densité très précises : 1,060, 1,064, 1,068, 1,076, 1,080, 1,084, 1,088, 1,092, 1, 096, 1,100, 1,104, 1,108, 1,112, 1,116, 1,120, 1,124, 1,128, 1,132 et 1,136 g/ml à 20°C. Le sang total est prélevé sur tube hépariné puis centrifugé 20 min à 3500 g afin de «culoter» les GR. Le culot de GR obtenu est lavé trois fois à +4°C en solution saline isotonique 5 min à 3000 g. Après resuspension du culot globulaire une solution diluée au demi dans la solution saline isotonique à température ambiante (TA) est préparée. Les cellules s’équilibrent 15 min à TA. Puis 0,5 à 1 cm de chaque mélange de phtalates de densité différente est placé dans un tube à hématocrite distinct. Puis chaque tube est rempli sur 2 cm environ avec les GR lavés du patient à l’aide d’une seringue de 1 mL avec une aiguille 26G en faisant très attention à ne pas injecter de bulles. Chaque tube à hématocrite est scellé d’un seul côté et centrifugé à 20°C 10 minutes à 10000 g. La hauteur de la colonne de GR en dessous du phtalate est mesurée pour chaque tube en utilisant un papier millimétré ou une règle sous une loupe. Le pourcentage de GR en dessous de la couche de phtalate est calculée comme suit : cellules en dessous/(cellules en dessous+ cellules au-dessus) (Figure 38).

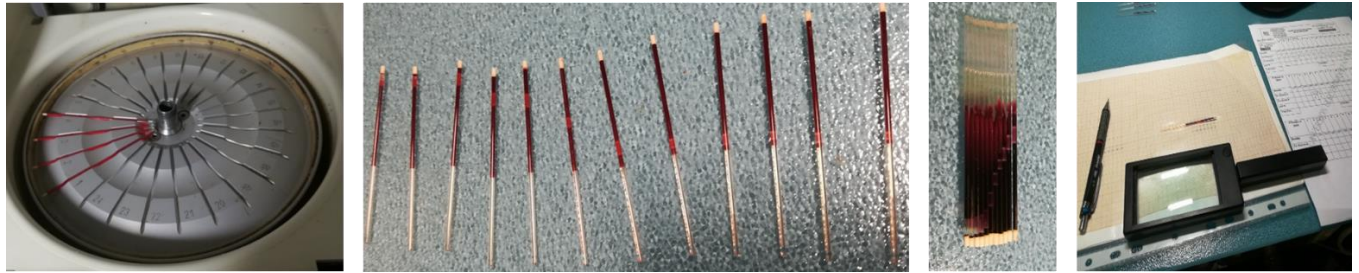


Figure 38 : Technique de mesure de la densité des GR en gradient de phtalates

(Permission Dr Noizat)

3.7 Etude ARN

Les transcrits sont extraits depuis du sang total prélevé sur tubes Paxgene grâce à un automate Maxwell RSC avec une cassette réactif RNA simplycell suivant le protocole du fabricant (Promega®). L'amplification se fait de manière ciblée sur les régions d'intérêt après une étape de reverse-transcription permettant d'obtenir des cDNAs. La migration électrophorétique en gel d'agarose et le séquençage Sanger sont réalisés sur les amplicons pour mettre en évidence d'éventuels saut ou insertion de séquences.

Une étude semi-quantitative par RT-Q-PCR permet d'évaluer la quantité totale de transcrits d'un gène cible donné. Il y a une amplification du gène cible et d'un gène de ménage qui est *MPP1* pour les gènes codant pour les protéines de membrane du GR. L'analyse se fait sur un LC480 (Roche®) en utilisant un agent intercalant de l'ADN : le SYBR green.

Le gène de « ménage » ou gène de référence doit être adapté selon le gène cible en fonction des résultats sur les cDNA témoins. Les gènes de ménage utilisés sont *MPP1*, *ABL* ou *GAPDH*. Les conditions des techniques ARN sont détaillées en Annexe 4 - Conditions des réactions ARN.

3.8 Démarche collaborative

3.8.1 Carte des collaborations

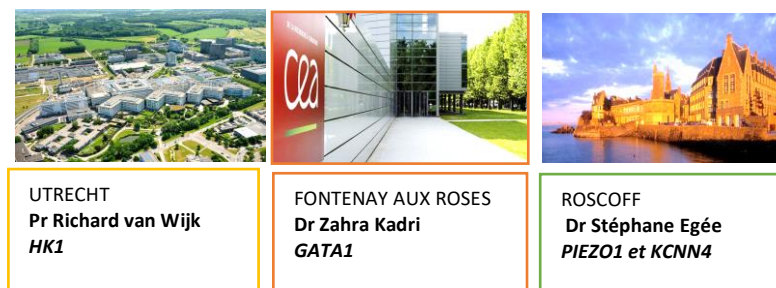


Figure 39 : Collaborations

Plusieurs collaborations ont pu être mises en place au laboratoire de génétique de l'Hôpital Henri Mondor dans le cadre des pathologies constitutionnelles du GR afin d'aboutir de façon plus

efficace à une réponse quant à la pathogénicité des variants de signification incertaine mis en évidence en SHD (Figure 39).

Nous ne détaillerons pas toutes ces collaborations mais uniquement celle développée avec l'équipe du Dr Stéphane Egée à Roscoff concernant l'étude fonctionnelle de VSI des gènes *PIEZO1* et *KCNN4* ayant abouti à une publication dans l'American Journal of Hematology (AJH) en 2021.

3.8.2 FOCUS sur la collaboration avec le CNRS de Roscoff

Deux tubes héparinés sont envoyés via le centre de tri de l'Hôpital Henri Mondor pour le patient et un témoin normal. Les échantillons sont acheminés en 24h à +4°C. Différents tests sont réalisés directement sur les GR.

3.8.2.1 Mesure du contenu en eau

Ces trois mesures sont importantes car elles nous permettent d'interpréter les données obtenues lors des mesures de variations de potentiel de membrane. En effet, l'intensité des courants ioniques qui va engendrer les variations de potentiel de membrane sont toujours dépendantes du gradient électrochimique (donc de la concentration intracellulaire en ions). Il est donc important de connaître la quantité d'eau moyenne dans les cellules. Des aliquots de 0,5 ml de sang total hépariné sont réalisés dès réception dans des tubes de polyéthylène micro test et centrifugés à 20 000g pendant 10 min à 4 °C. Le culot globulaire est récupéré en coupant le tube pour ne récupérer que ce culot. Puis il est pesé à J0 puis après 24h à 90°C à l'étuve. Cette technique de mesure permet de s'affranchir de l'effet de la modification de formes des GR sur le contenu en eau. Après cette mesure, le culot de GR asséché est lysé dans 1mL d'eau MilliQ.

3.8.2.2 Analyse morphologique des cellules.

A leur arrivée à Roscoff, des frottis sanguins sont réalisés et fixés au méthanol puis colorés 10 minutes au Giemsa 5% (sigma-aldrich). Ces frottis sont ensuite analysés en microscopie à l'objectif x100 puis traités sous ImageJ (Schindelin et al., 2012) afin de déterminer les paramètres suivants : la surface projetée, la circularité et la *roundness*. Ce type de fixation peut induire un biais sur la forme des cellules, mais ayant toujours un contrôle d'envoi les différences sont très visibles.

$$Circularity = 4\pi \frac{Area}{(perimeter)^2}$$

$$Roundness = 4 \times \frac{Area}{\pi \times [major\ axis]^2}$$

3.8.2.3 Mesure de variation de potentiel.

La technique employée est celle dite du CCCP ou méthode Macey-Bennekou-Egée. Le sang hépariné est lavé trois fois dans une solution saline non tamponnée par centrifugation à 3000 g pendant 5 minutes. Le *buffy coat* et le plasma sont rejetés et seul le culot globulaire est utilisé. Une centrifugation finale de 1 minute à 15 294 g permet d'obtenir un culot qui peut être stocké à +4°C jusqu'à son utilisation.

Les cellules sont injectées dans une solution non tamponnée constituée simplement par des ions, et contenant un protonophore : le CCCP à 10 μM (Macey et al., 1978; Bennekou, 1988; Monedero Alonso et al., 2021; Jansen et al., 2021). Le protonophore va favoriser la distribution des protons à travers la membrane du GR qui est directement corrélée dans le globule rouge aux variations de potentiel. Comme le contenu intracellulaire est par contre très tamponné (du fait de la très forte concentration en Hb) le pH intracellulaire reste constant ce qui est le contraire du milieu extérieur. Donc en mesurant le pH extracellulaire en continu on peut ainsi connaître les variations de potentiel des cellules en milieu non tamponné. En fin d'expérience afin d'avoir les valeurs exactes et absolues, on lyse les cellules avec du triton X. A ce moment là $\text{pH}_i = \text{pH}_o$ et on a donc le zéro. Le potentiel de membrane peut être estimé de la manière suivante :

$$V_M = 61.51 \text{ mV}(\text{pH}_i - \text{pH}_o)$$

Pour les patients atteints de syndrome de Gardos (mutation dans le gène *KCNN4*), la sensibilité du canal au Ca^{2+} a été testée en premier lieu. Pour réaliser cette expérience, du NS309 est utilisé. Ce composé a la particularité d'augmenter l'affinité du canal GARDOS pour le calcium, le canal pouvant alors s'activer aux concentrations intracellulaires normales. Les concentrations 10, 50 et 100 μM de NS309 sont testées. A ces concentrations, des cellules normales ne vont présenter qu'une légère hyperpolarisation (i-e une déflexion vers le bas, potentiel plus négatif). Si le canal muté présente une sensibilité plus importante, ou si la cellule présente des concentrations en calcium intracellulaire plus importantes, alors la déflexion sera plus importante (hyperpolarisation plus marquée).

On utilise l'A23187 à 10 μM comme contrôle interne. Il s'agit d'un composé qui crée des pores au niveau de la membrane permettant le passage du calcium. Il permet donc d'activer le canal Gardos à son maximum. Cette expérience est réalisée sur un temps plus long, car après l'hyperpolarisation, peut survenir une « repolarisation » induite par l'activation des canaux cationiques non sélectifs. Ceux-ci sont généralement plus actifs dans les cas du vieillissement des cellules et souvent chez les patients avec DHSt.

Pour les patients porteurs de mutations *PIEZO1*, le NS309 est également utilisé. Il permet de déterminer si la concentration intracellulaire en Ca^{2+} est altérée ou pas. Dans la même logique que pour le canal GARDOS, si la concentration en calcium est augmentée (par exemple du fait d'un gain de fonction de *PIEZO1*) alors l'hyperpolarisation qui suit l'addition de NS309 sera plus prononcée.

YODA1 est un agoniste connu du canal *PIEZO1* également utilisé pour tester l'effet de mutations notamment simplex de *PIEZO1*. YODA1 augmente la probabilité d'ouverture de *PIEZO1* mais ralentit aussi sa période réfractaire d'inactivation. Les canaux *PIEZO1* activés par YODA1 restent ouverts quatre fois plus longtemps que ceux ouverts via un stimulus mécanique (Syeda et al., 2015). En cas de mutation gain de fonction de *PIEZO1* l'utilisation de YODA1 chez un patient

montre une hyperpolarisation plus importante de la membrane des GR et un retour à l'état basal beaucoup plus lent que chez un témoin normal.

Ce qui permet de tirer des conclusions quant à l'intensité initiale d'activité du canal PIEZO1.

(Annexe 5 - Descriptif des réactifs techniques ROSCOFF et Figure 40)

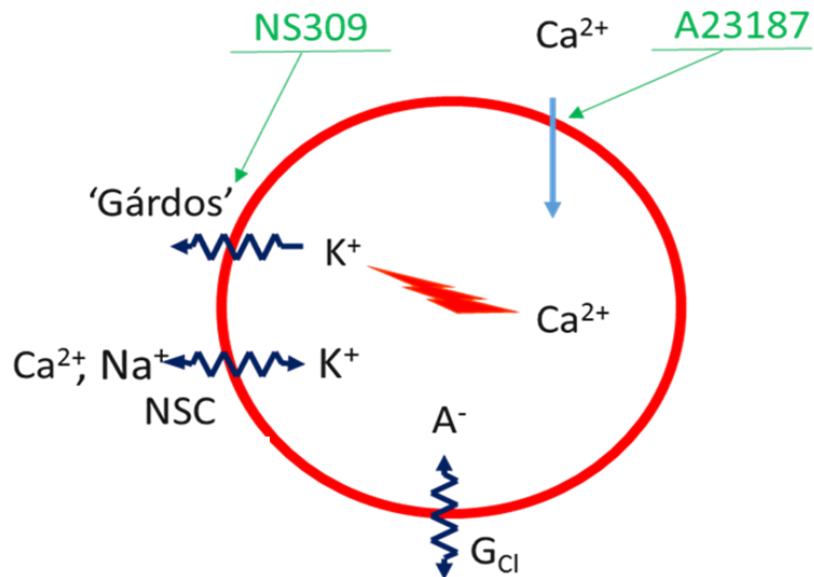


Figure 40 : Schéma des effets sur les flux ioniques des composés utilisés à Roscoff

(Permission Dr Egée)

4 Résultats

4.1 Résultats du SHD

4.1.1 Article 1 OJRD 2020

4.1.1.1 Présentation

Cet article présente les résultats de séquençage haut débit de l'exome chez 40 patients présentant une anémie hémolytique constitutionnelle dont 20 patients avec une sphérocytose héréditaire. Nous avons utilisé une capture exomique et une analyse bioinformatique ciblée sur une liste de gènes connus dans les anémies hémolytiques constitutionnelles dans un premier temps, puis étendu l'analyse via une analyse sur mots clés phénotypiques. Nous avons identifié la cause moléculaire dans 100% des cas de SH et 65% de ceux avec une hémolyse inexplicée. Nous avons pu étendre l'analyse au-delà de la liste des gènes connus dans certains cas et mis en évidence des gènes candidats comme *ADAR* ou *TRPV4*. Nous avons également proposé une nouvelle stratégie de prise en charge diagnostique des anémies hémolytiques constitutionnelles en replaçant l'étude moléculaire plus haut dans l'arbre décisionnel. Cet article est paru en 2020 et est basé sur des résultats de 2017 et 2018, c'est-à-dire avant le déploiement des plateformes de séquençage très haut débit (STHD) nationales et l'usage plus répandu du SHD dans le diagnostic des AHC.


Nous présentons également les résultats d'études familiales qui ont pu être réalisées chez ces patients.

RESEARCH

Open Access



Exome sequencing for diagnosis of congenital hemolytic anemia

Lamisse Mansour-Hendili^{1,2*} , Abdelrazak Aissat^{1,2}, Bouchra Badaoui³, Mehdi Sakka^{1,2}, Christine Gameiro¹, Valérie Ortonne¹, Orianne Wagner-Ballon^{2,3}, Serge Pissard^{1,2}, Véronique Picard⁴, Khaldoun Ghazal⁵, Michel Bahuaou¹, Corinne Guitton⁶, Ziad Mansour⁷, Mylène Duplan⁸, Arnaud Petit⁹, Nathalie Costedoat-Chalumeau¹⁰, Marc Michel^{2,11}, Pablo Bartolucci^{2,11,12}, Stéphane Moutereau^{1,2}, Benoît Funalot^{1,2} and Frédéric Galactéros^{2,11,12}

Abstract

Background: Congenital hemolytic anemia constitutes a heterogeneous group of rare genetic disorders of red blood cells. Diagnosis is based on clinical data, family history and phenotypic testing, genetic analyses being usually performed as a late step. In this study, we explored 40 patients with congenital hemolytic anemia by whole exome sequencing: 20 patients with hereditary spherocytosis and 20 patients with unexplained hemolysis.

Results: A probable genetic cause of disease was identified in 82.5% of the patients (33/40): 100% of those with suspected hereditary spherocytosis (20/20) and 65% of those with unexplained hemolysis (13/20). We found that several patients carried genetic variations in more than one gene (3/20 in the hereditary spherocytosis group, 6/13 fully elucidated patients in the unexplained hemolysis group), giving a more accurate picture of the genetic complexity of congenital hemolytic anemia. In addition, whole exome sequencing allowed us to identify genetic variants in non-congenital hemolytic anemia genes that explained part of the phenotype in 3 patients.

Conclusion: The rapid development of next generation sequencing has rendered the genetic study of these diseases much easier and cheaper. Whole exome sequencing in congenital hemolytic anemia could provide a more precise and quicker diagnosis, improve patients' healthcare and probably has to be democratized notably for complex cases.

Keywords: Hemolysis, Red blood cell, Membrane, NGS, Anemia, Congenital, Mutation

Background

Congenital hemolytic anemia (CHA) is a group of rare genetic disorders characterized by increased destruction of red blood cells (RBC) [1]. They result from corpuscular causes such as hemoglobin disorders, membrane diseases, RBC enzyme deficiencies or congenital dyserythropoietic anemia (CDA), or from extra-corpuscular causes such as

atypical hemolytic and uremic syndromes (aHUS) due to complement pathways dysfunctions.

Membrane disorders [2–5] include hereditary spherocytosis (HS, the most frequent cause in European population with nearly 1/2000 subjects affected, MIM 182900, 182,870, 270,970, 612,653, 612,690) [6]; hereditary elliptocytosis (HE, from 1/5000–1/10,000 in European population to 1/100 in West African populations, MIM 130600, 109,270, 611,804) [7]; hereditary pyropoikilocytosis (HPP, MIM 266140), which is a rare and severe subtype of HE, and hereditary stomatocytosis, with a dehydrated form (incidence of 1/50,000 individuals, MIM 616689) and an overhydrated form (incidence

* Correspondence: lamisse.mansour-hendili@aphp.fr

¹Département de Biochimie-Biologie Moléculaire, Pharmacologie, Génétique Médicale, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, F-94010 Creteil, France

²Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, F-94010 Creteil, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

lower than 1/100,000, MIM 185000) [8]. Transmission is often autosomal dominant (AD) but de novo mutations or autosomal recessive (AR) forms (as is the case in HPP) can occur.

Defaults in enzymatic pathways of RBC metabolism are numerous [9] the most frequent being Glucose-6 Phosphate Dehydrogenase (G6PD, MIM 300908) and Pyruvate Kinase deficiencies (MIM 266200) [10]. Most of them have AR inheritance but some are X-Linked (XL) (as is the case for G6PD deficiency).

CDA (MIMs 224,120, 615,631, 224,100, 105,600, 613, 673) is characterized by ineffective central erythropoiesis with progressive secondary iron overload and has AR, AD or XL transmission [11, 12]. Peripheral hemolysis can occur and misdiagnosis is often due to phenotypic overlap with other types of CHA [13, 14].

Clinical features of CHA vary from severe neonatal or even prenatal anemia with high morbidity and transfusion dependence to well-compensated hemolysis without anemia. In addition, clinical manifestations may be increased by associated comorbidities (such as hemochromatosis or hemoglobin variant) or during acute diseases, inflammatory conditions, or pregnancy.

Mutations causing CHA have been identified in more than 100 different genes, some of which are very large. Next generation sequencing (NGS) allows massive parallel sequencing of numerous genes and therefore appears as a very suitable approach for genetic dissection of CHA. Different NGS strategies have been developed over the last few years for CHA (Additional file 1, Supplementary Table S1). They included targeted gene panels (comprising 28 to 76 genes) with a success rate for diagnosis varying from 38 to 90%, depending on proband numbers (ranging from 2 to 62) and subtypes of anemia [15–23], and whole-exome sequencing (WES) in a few studies (limited to 1 to 7 probands, except two studies focusing on 38 Chinese cases of HS [24] and 24 cases of autosomal recessive HS [25]), with success rates between 29 and 100% [14, 24–32]. We used WES to explore 40 CHA patients: 20 with suspected HS and 20 with unexplained hemolysis (UH) despite available phenotype exploration. We first analyzed genomic data using a predefined list of 71 CHA genes (Additional file 1, Supplementary Table 2) and extended the analysis to WES when necessary. This approach allowed us to find a probable molecular cause in 82.5% of patients.

Methods (see supplementary material for more details)

Biochemical and hematologic tests

Standard laboratory tests included cell blood count, blood smear examination, hemolysis markers, RBC density (measured by the phthalate density-distribution method, as described by Bartolucci et al in 2012 [33],

with density curves profiles), hemoglobin study (beginning with isoelectric focusing and HPLC. In case of abnormalities, acid agar gel electrophoresis, Itano test, capillary electrophoresis and reverse phase HPLC could be performed, RBC enzymes activity (G6PD, Pyruvate Kinase, Hexokinase routinely measured) and EMA test (performed following the methods described by King et al in 2000 [34] and Girodon et al in 2008 [35]). When possible, osmolar gradient ektacytometry (Technicon®) and membrane protein electrophoresis (MPE) were performed.

DNA extraction

Peripheral blood EDTA sample was obtained from patients after written informed consent for genetic analysis. Genomic DNA was extracted using the Flexigene extraction kit, following manufacturer's recommendations (Qiagen; Hilden, Germany).

Sequencing and data analysis

Library preparation was performed from 100 ng of enzymatically fragmented genomic DNA using the Kapa library hyperprep kit, following manufacturer's recommendations (KAPABIOSYSTEMS, Wilmington, Massachusetts). Enrichment for exonic sequences was performed using the Medexome kit, following manufacturer's recommendations (NimbleGen, Madison, Wisconsin).

NGS sequencing

Captured libraries were sequenced on a Nextseq500 instrument (Illumina, San Diego, California, USA) with high-output FlowCell and reagents, in order to obtain 150 bp paired-end reads.

Bioinformatic analyses

Demultiplexing and .fastq files generation were performed using Bcl2fastq software (v.1.8.4). Trimming of low-quality bases (Phred score < 10) and adapter-contaminated ends was performed with Trimmomatic (v.0.6.1) (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). Alignment and variant calling were performed in duplicates, using both an in-house pipeline following the BWA/GATK best practices and the Seq-next software (JSI, Ettenheim, Germany). For our in-house bioinformatic pipeline, high-quality reads were mapped on the Human reference genome (GRCh37, hg19) using BWA-MEM (v.0.7.1). SAMtools (<http://www.htslib.org/>) and Picard (v.1.106, <https://broadinstitute.github.io/picard/>) were run to remove the duplicate reads. Mean depth of coverage was >171x for all samples with > 97.6% covered at least 30X. Targeted regions with depth under 30X were selected with the Depth Of Coverage GATK tool and manually checked using bam files loaded on two reads viewers, i.e. Alamut Visual

(Interactive Bioinformatics, Rouen, France) and IGV (Broad Institute, Cambridge, MA 02142, USA). For our first-line list of genes, all targeted regions were above 30X, excepted *GPX1* and *PGD* first exons, which were sequenced by Sanger. Exon 1 of *PIEZO1* was usually covered ~15X but was validated after a manual check of high-quality reads on bam viewers.

Variant calling was performed using the Genome Analysis Toolkit (v.3.8) with the Haplotype Caller tool in GVCF mode. VQSR filters were applied according to GATK guidelines (when $QD < 2$, $FS > 60$ for snps and > 200 for indels, $ReadPosRankSum < -8$ for snps and > -20 for indels, when $MQ < 40$, $MQRankSum < -12.5$ and $SOR < 3$).

Variant annotation

The quality-filtered variant calling files (VCF) obtained were gene- and region-based annotated on GRCh37, hg19 reference genome using Annovar [36] and dbSNP141.

Functional annotation was made using in silico prediction tools and amino acid conservation scores (SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), align GVGD (<http://agvgd.iarc.fr/>) and CADD (<https://cadd.gs.washington.edu/>)). MaxEntScan (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html) and Human Splicing Finder3.0 (<http://www.umd.be/HSF/>) were used for splicing effect predictions. Protein domain functions were determined by using the SMART software (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) and are available in Table S3. Functional classification following ACMG criteria [37] was performed using InterVar [38] and Ingenuity Variant Analysis (IVA) software (Qiagen).

Variants filtering and selection

According to ACMG guidelines, we excluded all variants tagged as Benign.

According to Annovar gene- or region-based annotations, we excluded variants disrupting microRNA binding sites, promoter, intergenic, ncRNA as well as intronic variants > 10 nucleotides of a splice site ($-splicing_threshold 10$) and kept only those present on an alternative transcript. Variants in regions with segmental duplications were excluded (genomicSuperDups).

All the possible inheritance patterns were tested according to disease knowledge. Variants with population frequency (Minor Allele Frequency, MAF) in gnomAD, ExAC, 1000 g and ESP6500 higher than 5% for AR disorders and higher than 1% for AD disorders were filtered out, except variants known to have modulating effects on phenotype, such as *HFE* variants (H63D or C282Y) involved in iron overload and the *SPTA1* alpha-Lely

polymorphism (c.6531-12C > T) involved in membrane disorders. This latter variant is known to be pathogenic when associated in *trans* with a deleterious variant of *SPTA1* [39].

The first-line analysis was focused on 71 known CHA genes as a target gene panel (Additional file 1, Supplementary Table S2). An extended WES analysis was performed using IVA filters “biological context” and “phenotype driven”. In addition, we performed a complementary analysis of 2138 genes encoding erythrocyte proteins identified by proteomic studies [40–42].

New variants

All new variants classified as VUS, likely pathogenic or pathogenic have been registered in the Clinvar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/clinvar/> see Additional file 1, Supplementary Table S4).

Sanger sequencing

Sanger sequencing was used to confirm each potentially deleterious variation found by NGS. Primers sequences and PCR conditions are available upon request.

Patients

Forty patients suffering from non-immune hemolysis with negative direct antiglobulin tests were submitted to WES sequencing. Clinical and biological data are available in Supplementary Tables S5 and S6 (normal values in Additional file 1 and Supplementary Table S7). Blood smear results and genetic results are available in Tables S8 and S11. In silico analysis of genetic variants is available in Additional file 1, supplementary Table S3.

Twenty patients had a HS phenotype, among which four were apparently sporadic cases (**P1**, **P3**, **P13**, **P14**). The 20 other patients had UH, with either discordant or non-conclusive phenotypical tests. For several patients, EMA test results were discordant with ektacytometry. In the other cases, EMA test and ektacytometry were either normal or atypical. Three of these patients had UH associated to a sickle cell trait (A/S). Several patients had no familial history. Despite of this fact they were considered as potential cases of CHA because phenotypic exploration of common acquired causes of hemolytic anemia such as complete antiglobulin tests (Coombs test) and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria test remained negative.

Results

Genetic results are available in Tables 1 and 2 and in Additional file 1, supplementary Tables S3 and S8 to S11. Clinico-biological data are available in Additional file 1, supplementary Tables S5 to S7.

We defined two groups: one with clear phenotype (HS group) and one with unclear phenotype (UH group).

Table 1 Genetic results of HS patient

Patient ID	Gene name	transcript	Nucleotide change	AA change	zygosity	References rsNumber	gnomAD allele frequency	Polyphen-2	Mutation taster	MaxEnt Scan	CADD score	ACMG class
P1	<i>ANK1</i>	NM_020476	c.5152C > T	p.Gln1718*	het	No	0	NA	NA		37	LP
	<i>HBA1</i>	NM_0005558	c.389T > C	p.L130P	het	Darbellay et al 1995	0	PD	DC		23.4	LP
P2	<i>ANK1</i>	NM_020476	c.1702-2A > C		het	No ref	0	NA	NA	-100%	34	LP
	<i>HFE</i>	NM_000410	c.187C > G	p.H63D	het	Kaczorowska-Hac et al 2016 rs1799945	10.83%	B	P		12.8	VUS
	<i>HFE</i>	NM_000410	c.845G > A	p.C282Y	het	Kaczorowska-Hac et al 2016 rs1800562	3.37%	PD	DC		25.2	P
P3	<i>SLC4A1</i>	NM_000342	c.1458C > G	p.Y486*	het	No	0	NA	NA		35	LP
P4	<i>SLC4A1</i>	NM_000342	c.486-2A > G		het	no	0	NA	NA	-100%	25.3	P
P5	<i>SPTB</i>	NM_001024858	c.1331_1338del	p.Leu444Profs*3	het	Dhermy et al 1998	0	NA	DC			P
P6	<i>ANK1</i>	NM_020476	c.5497C > T	p.R1833*	het	Hayette et al 1998	0				47	P
P7	<i>SLC4A1</i>	NM_000342	c.1322T > G	p.L441R	het	No	0	PD	DC	No effect	26.8	VUS
P8	<i>ANK1</i>	NM_020476	c.1801-17G > A		het	Duru et al rs786205243	0			Creation of a cryptic acceptor	8.2	LP
P9	<i>ANK1</i>	NM_020476	c.4462C > T	p.R1488*	het	Ozcan et al 2003 rs777701149	0				36	P
P10	<i>ANK1</i>	NM_020476	c.1A > G	p.?	het	no	0	NA	NA	NA	14.3	P
P11	<i>SPTB</i>	NM_001024858	c.2863C > T	p.R955*	het	no	0	NA	NA	NA	37	P
	<i>SPTA1</i>	NM_003126	c.6421C > T	p.R2141W	het	Niss et al 2016 rs41273519	0.2%	PD	DC		27.4	LP
P12	<i>SPTB</i>	NM_001024858	c.4973 + 5G > A		het	no	0	NA	NA	-100%	16.48	VUS
P13	<i>ANK1</i>	NM_020476	c.534delC	p.H178Qfs*75	het	no	0	NA	NA			LP
P14	<i>SPTB</i>	NM_001024858	c.5623C > T	p.Q1875*	het	no	0	NA	NA		48	LP
P15	<i>SLC4A1</i>	NM_000342	c.1462G > A	p.V488M	het	Alloisio et al 1997 rs28931584	0.00041%	PD	DC	No effect	24.5	P
P16	<i>ANK1</i>	NM_020476	c.712-2A > G		het	no	0	NA	NA	-100%	34	LP
P17	<i>SLC4A1</i>	NM_000342	c.2423G > A	p.R808H	het	Bogardus et al 2012 rs866727908	0	PD	DC	No effect	33	LP
	<i>PIEZO1</i>		c.2578G > A	p.V860M	het	rs532390680	0.0028%	PossD	DC	No effect		VUS

Table 1 Genetic results of HS patient (Continued)

Patient ID	Gene name	transcript	Nucleotide change	AA change	zygosity	References rsNumber	gnomAD allele frequency	Polyphen-2	Mutation taster	MaxEnt Scan	CADD score	ACMG class
P18	<i>SLC4A1</i>	NM_000342	c.2279G > A	p.R760Q	het	Jarolim et al 1995	0	PD	DC	No effect	29.6	LP
P19	<i>SPTB</i>	NM_001024858	c.3436dup	p.L1146Pfs*36	het	no	0	NA	NA			LP
	<i>SPTB</i>	NM_001024858	c.6101G > A	p.S2034N	het	no	0.00041%	B	DC	No effect	22.9	VUS
P20	<i>SPTB</i>	NM_001024858	c.3916C > T	p.R1306*	het	No rs150471537	0	NA	NA		38	LP

Table 1 legend: Variants description and classification according to ACMG guidelines as benign likely benign (LB) variant of uncertain significance (VUS) likely pathogenic (LP) or pathogenic (P). In silico study of missense variations was assessed thanks to Polyphen-2, Mutation taster and CADD score algorithm. HGMD professional and pubmed web interface were used to check for variants description in literature. Abbreviations: het: heterozygous state; hom: homozygous state; hem: hemizygous state; F: female; M: male; HS: hereditary spherocytosis; gnomAD: genome aggregation database <https://gnomad.broadinstitute.org>; ND: not done; NA: not applicable; DC: disease causing; P: polymorphism; PD: probably damaging; PossD: possibly damaging; B: benign.

The different types of variants identified are summarized in Fig. 1.

HS group

We identified the probable genetic cause of hemolysis in all HS patients using target genes panel analysis (71 CHA genes) on WES data. Nineteen patients were heterozygous carriers of one mutation in *ANK1* (8 patients), *SLC4A1* (6 patients), or *SPTB* (5 patients). All patients had different mutations, among which 13 were novel and 8 had already been reported. In one family with typical HS (P11 and affected relatives), affected members harbored 2 heterozygous probably damaging variations, one in *SPTB* (stop-gained) and the other in *SPTA1* (already-reported missense mutation, previously found in a case of HPP which also harbored the alpha-Lely polymorphism *in trans*). Such an association has rarely been reported in the literature [15, 16, 43, 44]. In 3 families (P4, P10 and P11), genetic tests could be extended to other affected family members and showed cosegregation of mutations and disease (Fig. 2). Two HS patients also had additional mutations in other CHA genes. P1 carried a heterozygous mutation of alpha-globin gene, called Tunis-Bizerte hemoglobin, responsible for an alpha-thalassemia trait [45]. P17 carried a variant of uncertain significance (VUS) in *PIEZO1* (p.V860M). In total, 3 out of 20 HS patients (P1, P11 and P17) had variations in two different CHA genes. Patient P2, who had significant iron overload also harbored 2 variants in *HFE* (H63D and C282Y) which had been previously found during iron overload exploration.

UH GROUP

Twenty patients were classified as UH because of discordant or non-contributive clinical features and/or biological tests. Familial segregation study could be performed in 6 families (P25, P27, P31, P33, P36, P40, Fig. 2).

Twelve UH patients have been fully characterized (P21, P22, P25, P29, P30, P31, P32, P36, P37, P38, P39, and P40) by target gene panel analysis of 71 CHA genes on the WES data. One UH patient (P35) could be fully characterized thanks to WES analysis. Seven other UH patients have not been fully characterized (P23, P24, P26, P27, P28, P33 and P34) despite extended WES analysis. Interestingly, in those patients WES identified two new possible target genes.

Among the 12 fully characterized UH patients, nine harbored mutations in genes encoding membrane proteins. *SPTA1* was the most frequently mutated gene (in 6 probands: P21, P22, P29, P36, P37, and P39). Variations in *SPTA1* result in HE, HPP or HS depending on variants type and phase. In P37 and P39, genotypes and phenotypic data (clinical features, blood smear) were suggestive of HPP. We could not clearly decipher between HE or HPP for P21, 22 and P29. Other membrane genes with mutations were *PIEZO1* (P30 and P36, DHSt), *KCNN4* (P31, GARDOS MIM 616689), *SPTB* (P32, elliptocytosis) and *SLC4A1* (P36, SEA ovalocytosis, MIM 166900). Among them, some had original presentation. P30 had myelodysplasia and important hemolysis without any family history. She carried a constitutional (present in blood and hair bulb DNA) heterozygous *PIEZO1* variant of uncertain significance (VUS) (p.P376A) and had atypical ektacytometry results. P36 is one of the 3 A/S symptomatic patients explored in our study (P29, P32 and P36). This woman originating from Comoros islands experienced spleen infarct after a long-distance flight and showed the association of a Hbs trait, SEA ovalocytosis (*SLC4A1*: p.Ala400_Ala408del), a *G6PD* MATERA A- p.V98M variant at heterozygous state [46], a homozygous *SPTA1* variation (p.E2224D) and a *PIEZO1* mutation (p.R457C) already involved in DHSt [16]. Her daughter (P36-1) also presented with hemolytic anemia and harbored the same mutations (the *SPTA1* variant being heterozygous). Her blood smear

Table 2 Genetic results of UH patients

Patient ID	Gene name	Transcript	Nucleotide change	AA change	zygosity	references	gnomAD allele frequency	Polyphen-2	Mutation taster	MaxEnt Scan	CADD score	ACMG class
P21	SPTA1	NM_003126	c.6600+5G>T		het	no	0	NA	NA	-62.5%	18.74	VUS
	SPTA1	NM_003126	c.6531-12C>T		het	Alpha-Lely polymorphism rs28525570	25%					
P22	SPTA1	NM_003126	C.2898G>A	p.(=)	het	no	0	NA	NA	-29.3%	14.2	VUS
	SPTA1	NM_003126	c.6531-12C>T		het	Alpha-Lely polymorphism rs28525570	25%					
P23	ALAS2	NM_000032	c.-258C>G		het	Bekri et al 2003 rs140772352	0.54%	NA	NA	NA		VUS
P24	TRPV4	NM_021625	c.1913C>T	p.P638L	hom	No rs35058636	0.03% (no homozygotes)	B	DC	No effect		VUS
	ADAR	NM_001111	c.1586C>T	p.P529L	het	no	0	PD	DC	No effect		VUS
P25	SEC23B	NM_001172745	c.40C>T	p.R14W	het	Russo et al 2011 rs121918222	0.022%	PossD	DC	No effect		P
	SEC23B	NM_001172745	c.325G>A	p.E109K	het	Russo et al 2011 Rs121918221	0.023%	PD	DC	No effect		P
P26	HAMP	NM_021175	c.49_54del	p.L17_L18del	het	no	0	NA	NA	No effect		VUS
	HFE	NM_000410	c.845G>A	p.C282Y	het	rs1800562	3.37%	PD	P	No effect		P
	CD46	NM_172359	c.402T>G	p.I134M	het	no	0	PossD	P	No effect		VUS
P27	CFH	NM_00186	c.2850G>T	p.O950H	het	Mohlin et al 2015 rs149474608	0.39%	B	P	No effect		LB
P28	SEC23B	NM_001172745	c.1276G>A	p.V426I	het	Schwartz et al 2009 rs41309927	4.3%	B	P	No effect		VUS
	CDAN1	NM_138477	c.256C>T	p.P86S	het	no	0.052%	B	P	No effect		VUS
P29	SPTA1	NM_003126	c.1688G>A	p.R563Q	het	rs202243588	0.11%	PD	DC	Possible new acceptor site	25.1	VUS
	HBB	NM_000518	c.20A>T	p.E7V	het	Yes coding for Hbs rs334	0.44%	B	P		13.8	P
	SPTA1	NM_003126	c.6531-12C>T		het	Alpha-Lely polymorphism rs28525570						
P30	PIEZO1	NM_001142864	c.1126C>G	p.P376A	het	no	0	B	P	Possible new acceptor site		VUS
P31	KCNM4	NM_002250	c.1055G>A	p.R352H	het	Rappetti Mauss et al 2015 rs774455945	0	PossD	DC	No effect		P

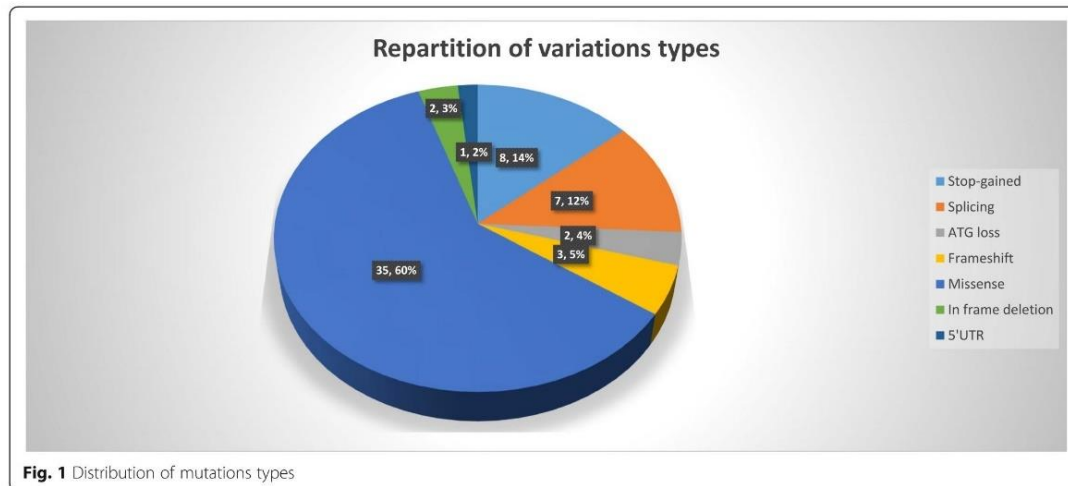
Table 2 Genetic results of UH patients (Continued)

Patient ID	Gene name	Transcript	Nucleotide change	AA change	zygosity	references	gnomAD allele frequency	Polyphen-2	Mutation taster	MaxEnt Scan	CADD score	ACMG class
P32	PIEZO1	NM_001142864	c.3629C>T	p.A1210V	het	No rs761971227	0.006%	B	DC	No effect		LP
	PIEZO1	NM_001142864	c.3629C>T	p.A1210V	absence							
	SPTB	NM_001024858	c.16706C>A; 6737C>T	p.[L2236M; A2246V]	Het in cis	no	0	B/PD	DC/P	No effect		VUS
	HBB	NM_000518	c.20A>T	p.E7V	het	Yes coding for HBS rs334	0.44%	B	P		13.8	P
P33	G6PD	NM_000402	c.538G>A	p.V180I	het	no	0	PossD	DC	No effect		VUS
	SPTB	NM_001024858	c.6271C>A	p.P2091T	het	No rs372733273	0.0065%	B	DC	no effect		VUS
P34	HFE	NM_000410	c.187C>G	p.H63D	hom	Kaczoewska-Hac et al. 2016 rs1799945	10.83%	B	P	No effect		LB
P35	ABCG8	NM_022437	c.-27G>A		het	no	0	NA	NA	NA		VUS
	ADAMTS13	NM_139025	c.119C>G	p.A40G	het	No rs782213090	0.00041%	B	P			VUS
	ADAMTS13	NM_139025	c.4007G>A	p.R1336Q	het	No No rs	0.0012%	PD	P			VUS
	SH2B3	NM_005475	c.1A>G	p.07	het	no	0	NA	NA	No effect		LP
P36	SCN9A	NM_002977	c.2938G>T	p.A980S	het	no	0	PossD	DC	No effect		VUS
	SPTA1	NM_003126	c.6672A>C	p.E2224D	hom	No Rs142775522	1.5% no homozygotes	PD	DC	No effect	22.3	VUS
P37	SLC4A1	NM_000342	c.1199_1225del	p.A400_408del	het	Wilder et al. 2009 rs769664228	0.0047%	PD	DC			LP
	PIEZO1	NM_001142864	c.1369C>T	p.R457C	het	Russo et al 2018	0	PD	DC	No effect		LP
	G6PD	NM_000402	c.292G>A	p.V98M	het	Vulliamy et al 1988 rs1050828	1.15%					LP
	HBB	NM_000518	c.20A>T	p.E7V	het	Yes coding for HBS rs334	0.44%	B	P		13.8	P
SPTA1	NM_003126	c.3291G>A	p.W1097*		het	no	0	NA	NA	NA	42	LP
	SPTA1	NM_003126	c.6531-12C>T		het	Alpha-Lely polymorphism rs28525570						
HFE	NM_000410	c.187C>G	p.H63D	hom	Kaczoewska-Hac et al. 2016 rs1799945	10.83%	B	P	No effect			LB

Table 2 Genetic results of UH patients (Continued)

Patient ID	Gene name	Transcript	Nucleotide change	AA change	zygosity	references	gnomAD allele frequency	Polyphen-2	Mutation taster	MaxEnt Scan	CADD score	ACMG class
P38	<i>CFH</i>	NM_00186	c.157C > T	p.R53C	het	Servais et al 2012 rs57785149	0.0014%	PD	DC	No effect		LP
P39	<i>PIEZO1</i>	NM_001142864	c.4246G > A	p.G1416R	het	No rs771605269	0.00033%	PD	DC	New cryptic acceptor site		VUS
	<i>SPTA1</i>	NM_003126	c.779T > C	p.L260P	het	Marchesi et al 1987 Rs121918634	0.017% (Afr)	PD	DC	No effect		LP
	<i>SPTA1</i>	NM_003126	c.6531-12C > T		het	Alpha-Lely polymorphism rs28525570						
P40	<i>ATP11C</i>	NM_1173694	c.2434C > T	p.P812S	hem	no	0.00055% no hemizygous	PD	DC	No effect		VUS
	<i>ANK1</i>	NM_020476	c.4558G > C	p.E1520Q	het	no	0.0021%	B	DC	No effect	26	VUS

Table 2 Legend: Variants description and classification according to ACMG guidelines as benign likely benign (LB), variant of uncertain significance (VUS), likely pathogenic (LP) or pathogenic (P). In silico study of missense variations was assessed thanks to Polyphen-2, Mutation taster and CADD score algorithm. HGMD professional and pubmed web interface were used to check for variants description in literature. Abbreviations: het: heterozygous state; hom: homozygous state; hem: hemizygous state; F: female; M: male; HS: hereditary spherocytosis; gnomAD: genome aggregation database <https://gnomad.broadinstitute.org>; ND: not done; NA: not applicable; DC: disease causing; P: polymorphism; PD: probably damaging; PossD: possibly damaging; B: benign.



showed anisopoikilocytosis and some stomatocytes. Another relative (P36–2) was explored and carried the same mutations as P36–1. He had a hemolytic anemia and a retinopathy typical of sickle cell disease.

Three fully characterized UH patients had mutations in genes not encoding membrane proteins: *SEC23B* in P25 with CDA type 2; *CFH* in P38 with aHUS; *ATP11C* in P40. P25 harbored 2 already described mutations in *SEC23B* gene at compound heterozygous state (Fig. 2) allowing correction of diagnosis towards CDA type 2 and not HS as initially suspected.

P38 carried a heterozygous mutation in *CFH* (p.R53C), which had previously been found in patients with preeclampsia-related SHUa [47], in complement-related glomerulopathies [48] and in familial forms of AMD (age-related macular degeneration, MIM 610698) [49]. She also carried a heterozygous *PIEZO1* VUS (p.G1416R) but had normal ektacytometry and blood smear. In this case one single mutation in *CFH* probably explains the entire phenotype (AMD, preeclampsia, hemolysis and altered renal function). P40 carried a likely pathogenic hemizygous variation in *ATP11C* (p.P812S). This X chromosome variation is recorded in gnomAD in only one heterozygous female (no hemizygous males or homozygous females recorded). He also carried one VUS in *ANK1*. His blood smear was normal and ektacytometry showed atypical profile with only dehydration and no change in osmotic resistance. Functional testing of flippase activity is in progress.

Among the 12 fully characterized UH patients, 6 had mutations in several CHA genes:

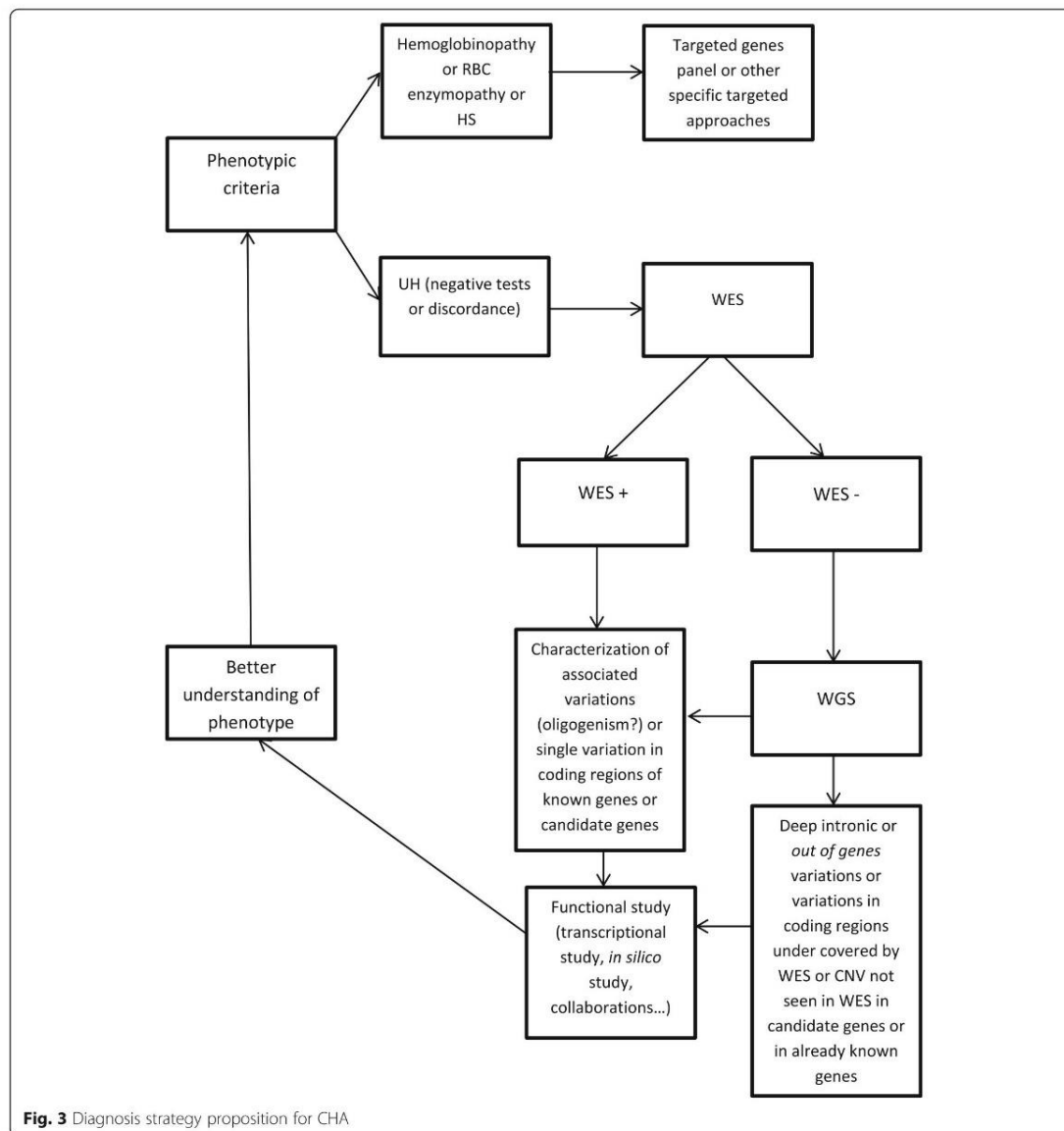
- P29 *HBB* S mutation and *SPTA1*
- P31, *KCNN4* and *PIEZO1*

- P32, *HBB* S mutation and *SPTB*
- P36, *HBB* S mutation, *SPTA1*, *SLC4A1*, *PIEZO1* and *G6PD*
- P38, *CFH* and *PIEZO1*
- P40, *ATP11C* and *ANK1*,

One additional UH patient was characterized thanks to WES analysis

P35 was found to harbor a heterozygous deleterious variation in *SH2B3*: c.1A > G (initiation codon loss). This result allowed to reconsider diagnosis towards a probable myeloproliferative condition. *SH2B3* somatic mutations have been reported in myeloproliferative neoplasms such as primary myelofibrosis [50]. He also carried a heterozygous VUS in the *SCN9A* gene c.2938G > T (p.A980S) which likely explained the severity of painful crises reported in this patient. *SCN9A* is involved in neurogenic painful syndromes [51].

Seven UH patients remained unsolved (P23, P27 and P28) or partially solved (P24, P26, P33 and P34) despite WES extended analysis. P23 carried a heterozygous *ALAS2* promoter variation (c.-258C > G), which had previously been reported as a cause of X-linked sideroblastic anemia (MIM 300751) [52]. This variation is present in gnomAD at an allelic frequency of 0.54%, with 39 hemizygous males, which suggests that it is most probably a rare benign polymorphism. No other relevant genetic variation was found. P27 was a female child with major hemolytic anemia at birth and neonatal splenomegaly with thrombocytopenia. Her mother, maternal aunt and maternal grand-father had the same phenotype. She carried a heterozygous variation in *CFH* (p.Q950H) [53], which was absent in the mother and the maternal aunt and is therefore not responsible for CHA in this



family. No other relevant genetic variation was found. **P28 was carrier** of two heterozygous variants in two genes involved in CDA: one in *SEC23B* (p.V426I) and one in *CDANI* (p.P86S). No case of digenic inheritance has yet been reported in CDA. No other relevant genetic variation was found. The other patients had a part of their phenotype explained by WES. In **P24**, candidate gene variations could be identified thanks to WES. A heterozygous missense variation was found in the gene encoding the RNA-specific Adenosine Deaminase

(*ADAR*) (p.P529L). No *ADAR* mutation has been associated to date with congenital hemolysis in humans but several studies showed a crucial role for *ADAR* in mouse erythropoiesis. This patient also carried an apparently homozygous variation of *TRPV4* (p.P638L), present in the gnomAD database at an allelic frequency of 0.03% without any homozygotes recorded (over > 138,000 subjects tested). *TRPV4* mutations have been found in skeletal dysplasia, arthropathies and in a familial form of osteonecrosis [54]. The *TRPV4* mutation could explain

osteonecrosis but not hemolysis. **P26** carried *HAMP* and *HFE* variations probably explaining iron overload and *CD46* variation for susceptibility to hemolysis. *HAMP* gene is out of our genes panel analysis. **P33** harbored *G6PD* and *SPTB* variations, which combination cannot explain the severe phenotype. **P34** had UH and iron overload, and variations in 3 genes: a homozygous p.H63D variation in *HFE*, which may contribute to iron overload even though its implication is not totally clear [55, 56], a heterozygous *ABCG8* VUS and 2 heterozygous *ADAMTS13* VUS. *ABCG8* mutations are found in AR sitosterolemia and AD xanthelasma [57]. A single heterozygous *ABCG8* variation is not sufficient to explain hemolysis. This patient had a normal platelet count and *ADAMTS13* enzyme activity testing showed a 39% decrease (suggestive of a heterozygous loss-of-function). Normal *ADAMTS13* activity in **P34** does not support a diagnosis of AR Thrombotic thrombocytopenic purpura (MIM 274150), and therefore cannot explain hemolysis.

In summary, among n UH patients, 12 patients could be fully characterized thanks to targeted analysis on CHA genes. Eight benefited from extended WES analysis leading to full characterization in one additional patient and 7 UH patients not fully characterized but two new potential target genes were identified by WES.

Discussion

In this study, WES sequencing allowed the identification of a genetic cause of CHA in 33 out of 40 patients (82.5%), including 20 HS patients (100%) and 13 UH patients (65%). All HS patients harbored mutations in already-known HS genes: *ANK1*, *SLC4A1*, *SPTB*, *SPTA1*. All identified variants (21, among which 13 novel) were classified as likely pathogenic or pathogenic loss-of-function mutations. A recent exomic study of 38 Chinese patients with suspected HS found mutations of *ANK1* or *SPTB* in all patients [24]. Gallagher et al in 2019 [25] reported on a group of 24 recessive HS patients explored by WES and whole genome sequencing (WGS), all having mutations found in *SPTA1*. Our results, together with those previously published, suggest that there are probably no other major HS genes. In mouse, beta-adducin deficiency has been shown to cause spherocytosis [58], but no mutations of adducins have yet been identified in human HS.

In UH patients, NGS analysis allowed diagnosis in 13 patients (**P21**, **P25**, **P29**, **P31**, **P22**, **P30**, **P32**, **P35**, **P36**, **P37**, **P38**, **P39**, and **P40**). Rate of positivity is lower in UH patients than in HS cases, probably because of the lack of a clear phenotype.

One important finding of our study is the frequent association of several genetic variants in different genes in a same patient, emphasizing the genetic complexity of CHA. Twenty two percents (9/40) of patients harbored

several variations in different CHA genes. Among HS patients, only 3 (15%) had variations in other genes, whereas in the UH group, 9/20 (45%) had an association of variants in different CHA genes. The frequent occurrence of multiple genetic variants in single UH patients suggests that this association could contribute to the complexity of the phenotype. Phenotypical tests alone are not able to detect all those variants associations, some of which can have therapeutic consequences (contra-indication of splenectomy in DHSt for example). Such associations of several deleterious variants in genes causing RBC diseases have rarely been reported [59–61] and could be explained in part by the patients'origins. For example, the P36 family that carried variations in 5 CHA genes originated from Comoros Islands, a region of endemic malaria. *Plasmodium* has been shown to exert a selective pressure on various RBC proteins [62].

Our study also emphasizes the usefulness of exomic approach in the field of CHA, both for discovery of candidate genes (such as *TRPV4* or *ADAR*) and for diagnosis reorientation. Thanks to exomic capture, we reorientated initial diagnosis for **P35** (probable myeloproliferative syndrome) and explained a part of the phenotype in **P24** (osteonecrosis and *TRPV4*), **P26** (*HAMP* and iron overload) and **P35** (painful crisis and *SCN9A*). The cases of **P27** remained unsolved despite large familial investigations. Exomic capture allowed us to find a possible cause for **P24's** osteonecrosis since this patient harbored a homozygous *TRPV4* variation. *TRPV4* encodes a non-selective calcium-permeant cation channel expressed in different cell types [63] but not in erythrocytes and it has never been associated with hemolysis. Mutations have already been involved in skeletal dysplasia, hereditary neuropathies, arthropathies [64] and recently in a familial case of osteonecrosis [65]. All variants reported were heterozygous and only one paper described a familial case of complex phenotype with severe intellectual disability and neuropathy associated with compound heterozygosity for *TRPV4* mutations [66]. Our patient does not present any neurological symptoms. In this patient, we also found an *ADAR* variation that could be a good candidate for hemolysis. No mutations in *ADAR* have yet been associated with hemolysis in humans. Previous studies in mouse showed that *ADAR* is implicated in erythropoiesis [67, 68]. *ADAR* heterozygous mutations are been found in dyschromatosis symmetrica hereditaria [69] and homozygous or compound heterozygous variations in Aicardi-Goutières syndrome [70].

During the last few years, several NGS studies of CHA have been published [14–24, 26–32, 71] and have shown their usefulness (Additional file 1, Supplementary Table S1). Two recent studies using targeted approaches, focused on 21 index cases and 62 families respectively [16,

17]. They obtained a positive rate (elucidation of the genetic cause of anemia) of 62 and 65% of cases respectively. In our study, this rate was 82.5%. In the two former studies and ours, the positive rate appears to be considerably higher than the WES success rate obtained in other genetic diseases, such as cardiomyopathies or intellectual deficiencies: 62 to 82.5% for CHA versus 30% on average for cardiomyopathies or intellectual deficiencies [72, 73]. The two recent studies of Wang R. et al 2018 and Gallagher et al 2019 reporting WES findings in relatively large CHA samples [24, 25] were only dedicated to HS patient. Our results suggest that WES is highly useful in CHA patients, whether they have HS or UH. Recommendations proposed by King et al in 2015 [13], and compiled by Kim et al in 2017 [74] concerning the indications of genetic testing for CHA diagnosis need to be updated, as they only recommended genetic testing in a limited number of cases and as a second diagnostic step. A recent article of Rets et al in 2019 suggests that targeted NGS becomes the diagnosis standard tool in CHA molecular testing and that WES and WGS could represent the future [75]. Our results show that molecular diagnosis with WES could easily be democratized and be of great help to understand patients' phenotype, adapting therapeutic approach (such as splenectomy) and to allow genetic counseling. Indeed, exomic approach appeared as particularly useful in UH cases and for complex phenotypes.

Conclusion

This work emphasizes the usefulness of WES in CHA in order to reach a right diagnosis for each patient. This allows clinical geneticists to provide a personally fitted genetic counseling and specialized clinicians to adjust treatment in some cases. When first-line phenotypic analyses have not been successful in elucidating the disease cause, genetic tests using NGS and especially WES sequencing appears as very helpful to uncover the intricate genetic defects causing CHA and associated manifestations. The recent developments of exomic or genomic sequencing technologies make them the most suitable and cheapest approaches for the genetic diagnosis of these disorders, keeping in mind the absolute necessity of pluridisciplinary teams able to deal with incidental or unexpected findings if needed.

Democratization of NGS should lead to update the current recommendations and diagnosis strategy concerning the place of genetic testing in CHA on Fig. 3. The frequent discovery of several mutations in different genes in a same patient also suggests to reconsider the genetic bases of CHA: apparently monogenic diseases may in fact be oligogenic, with satellite variations acting as modulators of the phenotype or resulting in new clinical entities.

Deeper mechanistic studies are warranted to better understand the relationship between genotype and phenotype, especially in patients with atypical or poorly described variants association and to explain VUS. However, some interactions may prove difficult to investigate with currently existing tools. The development of next generation phenotypic tools, such as RBC metabolomics and proteomics, may represent new steps in the exploration of RBC genetic disorders and key tools for variant interpretation.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01425-5>.

Additional file 1.

Abbreviations

AMD: Age-Related Macular Degeneration; AR: Autosomal recessive; AD: Autosomal dominant; CHA: Congenital hemolytic anemia; DHS: Dehydrated hereditary stomatocytosis; GFF: Glomerular filtration flow; HS: Hereditary spherocytosis; HPP: Hereditary pyropoikilocytosis; HE: Hereditary elliptocytosis; MDS: Myelodysplastic syndrome; RBC: Red blood cell; MPE: Membrane protein electrophoresis; MPN: Myeloproliferative neoplasms; NGS: Next generation sequencing; TPI: Triose phosphate isomerase; UH: Unexplained hemolysis; aHUS: Atypical hemolytic and uremic syndrome; VUS: Variant of uncertain significance; WES: Whole exome sequencing; WGS: Whole genome sequencing; XLD: X-linked disorder

Acknowledgements

We thank Ms. Cécile Aubrun for her help in patients' assessment.

Disclosures of conflicts of interest

none

Authors' contributions

L.M.H. analyzed and validated genetic data and wrote the paper; A.A. developed and performed bioinformatic analyses and reviewed the paper; B.B. performed EMA tests, examinations of blood smears and reviewed the paper; M.S. was in charge of enzymatic activities measurement; C.G. and V.O. performed genetic tests; O.W.B. performed EMA tests and reviewed the paper; S.P. was responsible for sickle cell disease genetic exploration; V.P. performed ektacytometry analysis and reviewed the paper; K.G. made membrane proteins electrophoresis; M.B. made enzymatic activities measurement and designed panel genes list; C.G. Z.M., M.D., A.P., N.C.C. and M.M. provided patients for study; P.B. provided patients for study and technical support for research; S.M. supervised enzymatic activities measurement and hemoglobin studies; B.F. supervised the entire study, validated genetic data and wrote the paper; F.G. supervised the entire study, provided patients and reviewed the paper. The author(s) read and approved the final manuscript.

Funding

No funding.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

All patients cited in the text have filled consent form for genetic analysis and consent to participate to this study.

Consent for publication

Consent for publication has been obtained.

Competing interests

No competing of interests.

Author details

¹Département de Biochimie-Biologie Moléculaire, Pharmacologie, Génétique Médicale, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, F-94010 Creteil, France. ²Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, F-94010 Creteil, France. ³Département d'hématologie et d'immunologie, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, F-94010 Creteil, France. ⁴Département d'hématologie, AP-HP, Hôpital Bicêtre, F-94270 Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁵Département de Biochimie, AP-HP, Hôpital Bicêtre, F-94270 Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁶Département d'hématologie pédiatrique, AP-HP, Hôpital Bicêtre, F-94270 Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁷Clinique ADASSA, Maternité, F-67000 Strasbourg, France. ⁸Département d'onco-hématologie pédiatrique, CHU d'Angers, 4 Rue Larrey, 49100 Angers, France. ⁹Département d'onco-hématologie pédiatrique, AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, F-75012 Paris, France. ¹⁰Département de médecine interne, AP-HP, Hôpital Cochin, F-75014 Paris, France. ¹¹Département de médecine interne, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, F-94010 Creteil, France. ¹²Unité des maladies génétiques du globule rouge (UMGGR), AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, F-94010 Creteil, France.

Received: 20 February 2020 Accepted: 27 May 2020

Published online: 08 July 2020

References

- Gallagher PG. Diagnosis and management of rare congenital nonimmune hemolytic disease. *ASH Educ Program Book*. 2015;2015(1):392–9.
- Gallagher PG. Hereditary elliptocytosis: spectrin and protein 4.1R. *Semin Hematol*. 2004;41(2):142–64.
- Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008;112(10):3939–48.
- Gallagher PG. Abnormalities of the erythrocyte membrane. *Pediatr Clin N Am*. 2013;60(6):1349–62.
- Andolfo I, Russo R, Gambale A, Iolascon A. New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. *Haematologica*. 2016;101(11):1284–94.
- Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet*. 2008;372(9647):1411–26.
- Glebe-Kakai C, Garbarz M, Lecomte MC, Leborgne S, Galand C, Bournier O, et al. Epidemiological studies of spectrin mutations related to hereditary elliptocytosis and spectrin polymorphisms in Benin. *Br J Haematol*. 1996; 95(1):57–66.
- Picard V, Guittion C, Thuret I, Rose C, Bendelac L, Ghazal K, et al. Clinical and biological features in PIEZO1-hereditary xerocytosis and Gardos-channelopathy: a retrospective series of 126 patients. *Haematologica*. 2019; 104(8):1554–64.
- Prchal JT, Gregg XT. Red cell enzymes. *ASH Educ Program Book*. 2005; 2005(1):19–23.
- Bianchi P, Fermo E, Glader B, Kanno H, Agarwal A, Barcellini W, et al. Addressing the diagnostic gaps in pyruvate kinase deficiency: consensus recommendations on the diagnosis of pyruvate kinase deficiency. *Am J Hematol*. 2019;94(1):149–61.
- Iolascon A, Esposito MR, Russo R. Clinical aspects and pathogenesis of congenital dyserythropoietic anemias: from morphology to molecular approach. *Haematologica*. 2012;97(12):1786–94.
- Gambale A, Iolascon A, Andolfo I, Russo R. Diagnosis and management of congenital dyserythropoietic anemias. *Expert Rev Hematol*. 2016;9(3):283–96.
- King M-J, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, et al. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(3):304–25.
- Hamada M, Doisaki S, Okuno Y, Muramatsu H, Hama A, Kawashima N, et al. Whole-exome analysis to detect congenital hemolytic anemia mimicking congenital dyserythropoietic anemia. *Int J Hematol*. 2018;108(3):306–11.
- Niss O, Chonot S, Dagaonkar N, Almansoori MO, Kerr K, Rogers ZR, et al. Genotype-phenotype correlations in hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2016;61:4–9.
- Russo R, Andolfo I, Manna F, Gambale A, Marra R, Rosato BE, et al. Multi-gene panel testing improves diagnosis and management of patients with hereditary anemias. *Am J Hematol*. 2018;93(5):672–82.
- Averbuch NS, Steinberg-Shemer O, Dgany O, Krasnov T, Noy-Lotan S, Yacobovich J, et al. Targeted next generation sequencing for the diagnosis of patients with rare congenital anemias. *Eur J Haematol*. 2018;101(3):297–304.
- Barreto RDO, Arrizabalaga B, la Hoz ABD, García-Orad Á, Tejada MI, García-Ruiz JC, et al. Detection of new pathogenic mutations in patients with congenital haemolytic anaemia using next-generation sequencing. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(6):629–38.
- Agarwal AM, Nussenzevelg RH, Reading NS, Patel JL, Sangle N, Salama ME, et al. Clinical utility of next-generation sequencing in the diagnosis of hereditary haemolytic anaemias. *Br J Haematol*. 2016;174(5):806–14.
- Roy NBA, Wilson EA, Henderson S, Wray K, Babbs C, Okoli S, et al. A novel 33-gene targeted resequencing panel provides accurate, clinical-grade diagnosis and improves patient management for rare inherited anaemias. *Br J Haematol*. 2016;175(2):318–30.
- Kedar PS, Gupta V, Dongerdiye R, Chiddarwar A, Warang P, Madkaikar MR. Molecular diagnosis of unexplained hemolytic anemia using targeted next-generation sequencing panel revealed (p.Ala337Thr) novel mutation in GPI gene in two Indian patients. *J Clin Pathol*. 2019;72(1):81–5.
- Moreno Carralero M-I, Horta Herrera S, Morado Arias M, Ricard Andrés M-P, Lemes Castellano A, Abio Calvete M, et al. Clinical and genetic features of congenital dyserythropoietic anemia (CDA). *Eur J Haematol*. 2018;101(3): 368–78.
- Aydin Koker S, Karapinar T, Oymak Y, Bianchi P, Fermo E, Gozmen S, et al. Identification of a novel mutation in the SEC23B gene associated with congenital dyserythropoietic anemia type II through the use of next-generation sequencing panel in an undiagnosed case of nonimmune hereditary hemolytic anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2018;40(7):e421–3.
- Wang R, Yang S, Xu M, Huang J, Liu H, Gu W, et al. Exome sequencing confirms molecular diagnoses in 38 Chinese families with hereditary spherocytosis. *Sci China Life Sci*. 1 2018;61(8):947–53.
- Gallagher PG, Maksimova Y, Lezon-Geyda K, Newburger PE, Medeiros D, Hanson RD, et al. Aberrant splicing contributes to severe α -spectrin-linked congenital hemolytic anemia. *J Clin Invest*. 2019 Apr 30;129(7):2878–87.
- Han JH, Kim S, Jang H, Kim SW, Lee MG, Koh H, et al. Identification of a novel p.Q1772X ANK1 mutation in a Korean family with hereditary spherocytosis. *PLOS ONE*. 2015;10(6):e0131251.
- Lacy JN, Ulirsch JC, Grace RF, Towne MC, Hale J, Mohandas N, et al. Exome sequencing results in successful diagnosis and treatment of a severe congenital anemia. *Mol Case Stud*. 2016;2(4):a000885.
- Khurana M, Edwards D, Rescorla F, Miller C, He Y, Sierra Potchanant E, et al. Whole-exome sequencing enables correct diagnosis and surgical management of rare inherited childhood anemia. *Mol Case Stud*. 2018;4(5):a003152.
- Kim M, Park J, Lee J, Jang W, Chae H, Choi H, et al. Hemolytic anemia with null PKLR mutations identified using whole exome sequencing and cured by hematopoietic stem cell transplantation combined with splenectomy. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(12):1605–8.
- Errichiello E, Vetro A, Mina T, Wischmeijer A, Berrino E, Carella M, et al. Whole exome sequencing in the differential diagnosis of diamond-Blackfan anemia: clinical and molecular study of three patients with novel RPL5 and mosaic RPS19 mutations. *Blood Cells Mol Dis*. 2017;64:38–44.
- Lin P-C, Chiou S-S, Lin C-Y, Wang S-C, Huang H-Y, Chang Y-S, et al. Whole-exome sequencing for the genetic diagnosis of congenital red blood cell membrane disorders in Taiwan. *Clin Chim Acta*. 2018;487:311–7.
- Ittiwut C, Natesirinikul R, Tongprasert F, Sathitsamiphong L, Choedamphai C, Fanhchaksai K, et al. Novel mutations in SPTA1 and SPTB identified by whole exome sequencing in eight Thai families with hereditary pyropoikilocytosis presenting with severe fetal and neonatal anaemia. *Br J Haematol*. 2019;185(3):578–82.
- Bartolucci P, Brugnara C, Teixeira-Pinto A, Pissard S, Moradkhani K, Jouault H, et al. Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis. *Blood*. 2012;120(15):3136–41.
- King M-J, Telfer P, Mackinnon H, Langabeer L, McMahon C, Darbyshire P, et al. Using the eosin-5-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74B(4):244–50.
- Girodon F, Garçon L, Bergoin E, Largier M, Delaunay J, Fénelant-Thibault M, et al. Usefulness of the eosin-5'-maleimide cytometric method as a first-line screening test for the diagnosis of hereditary spherocytosis: comparison with ektacytometry and protein electrophoresis. *Br J Haematol*. 2008;140(4):468–70.
- Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(16):e164.

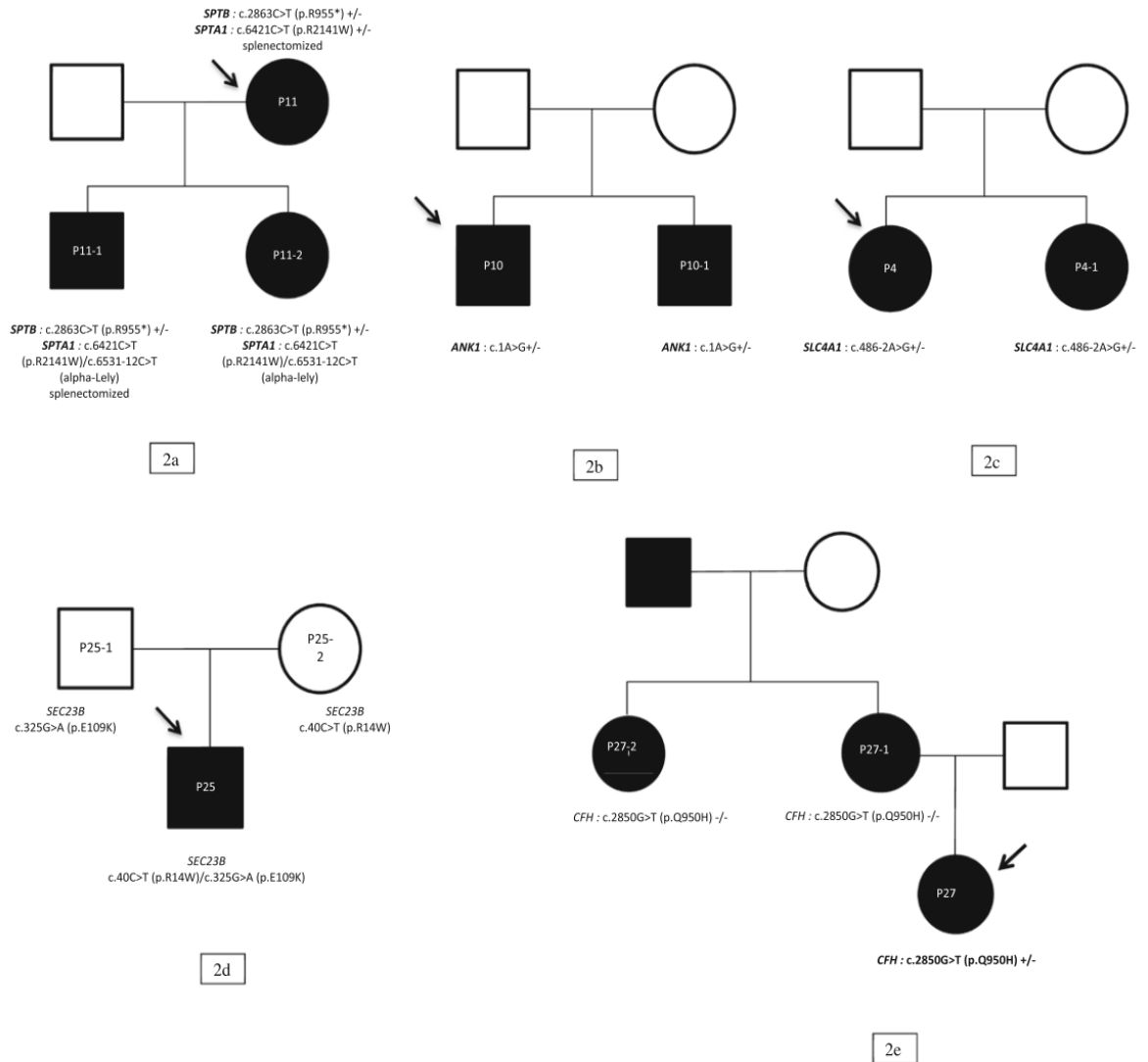
37. On behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–23.
38. Li Q, Wang K. InterVar: clinical interpretation of genetic variants by the 2015 ACMG-AMP guidelines. *Am J Hum Genet*. 2017;100(2):267–80.
39. Delaunay J, Nouyrigat V, Proust A, Schischmanoff P-O, Cynober T, Yvart J, et al. Different impacts of alleles α LEPRA and α LELY as assessed versus a novel, virtually null allele of the SPTA1 gene in trans. *Br J Haematol*. 2004;127(1):18–22.
40. Barasa B, Slijper M. Challenges for red blood cell biomarker discovery through proteomics. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1844(5):1003–10.
41. Gautier E-F, Leduc M, Cochet S, Bailly K, Lacombe C, Mohandas N, et al. Absolute proteome quantification of highly purified populations of circulating reticulocytes and mature erythrocytes. *Blood Adv*. 2018;2(20):2646–57.
42. Hegedűs T, Chaubey PM, Várady G, Szabó E, Sarankó H, Hofstetter L, et al. Inconsistencies in the red blood cell membrane proteome analysis: generation of a database for research and diagnostic applications. *Database (Oxford)*. 2015;2015:bav056.
43. Dherym D, Galand C, Bournier O, King M-J, Cynober T, Roberts I, et al. Coinheritance of α - and β -Spectrin gene mutations in a case of hereditary elliptocytosis. *Blood*. 1998;92(11):4481–2.
44. Christensen RD, Nussenzeig RH, Reading NS, Agarwal AM, Prchal JT, Yaish HM. Variations in both α -Spectrin (SPTA1) and β -Spectrin (SPTB) in a neonate with prolonged jaundice in a family where nine individuals had hereditary elliptocytosis. *Neonatology*. 2014;105(1):1–4.
45. Darbellay R, Mach Pascual S, Rose K, Graf J, Beris P. Haemoglobin Tunis-Bizerte: a new α globin 129 Leu \rightarrow pro unstable variant with thalassaemic phenotype. *Br J Haematol*. 1995;90(1):71–6.
46. Vulliamy TJ, D'Urso M, Battistuzzi G, Estrada M, Foulkes NS, Martini G, et al. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci*. 1988;85(14):5171–5.
47. Fakhouri F, Roumenina L, Provot F, Sallée M, Caillard S, Couzi L, et al. Pregnancy-associated hemolytic uremic syndrome revisited in the era of complement gene mutations. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2010;21(5):859–67.
48. Servais A, Noël L-H, Roumenina LT, Le Quintrec M, Ngo S, Dragon-Durey M-A, et al. Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies. *Kidney Int*. 2012;82(4):454–64.
49. Yu Y, Triebwasser MP, Wong EKS, Schramm EC, Thomas B, Reynolds R, et al. Whole-exome sequencing identifies rare, functional CFH variants in families with macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2014;23(19):5283–93.
50. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;116(6):988–92.
51. Fertleman CR, Baker MD, Parker KA, Moffatt S, Elmslie FV, Abrahamson B, et al. SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron*. 2006;52(5):767–74.
52. Bekri S. A promoter mutation in the erythroid-specific 5-aminolevulinatase synthase (ALAS2) gene causes X-linked sideroblastic anemia. *Blood*. 2003;102(2):698–704.
53. Mohlin FC, Nilsson SC, Levart TK, Golubovic E, Rusai K, Müller-Sacherer T, et al. Functional characterization of two novel non-synonymous alterations in CD46 and a Q950H change in factor H found in atypical hemolytic uremic syndrome patients. *Mol Immunol*. 2015;65(2):367–76.
54. Mah W, Sonkusare SK, Wang T, Azeddine B, Pupavac M, Carrot-Zhang J, et al. Gain-of-function mutation in TRPV4 identified in patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Med Genet*. 2016;53(10):705–9.
55. Kelley M, Joshi N, Xie Y, Borgaonkar M. Iron overload is rare in patients homozygous for the H63D mutation. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2014;28(4):198–202.
56. Barbara K-H, Marcin L, Jedrzej A, et al. The impact of H63D HFE gene carriage on hemoglobin and iron status in children. *Ann Hematol*. 2016;95(12):2043–8.
57. Bardawil T, Rebeiz A, Chaabouni M, et al. Mutations in the ABCG8 gene are associated with sitosterolemia in the homozygous form and xanthelasmas in the heterozygous form. *Eur J Dermatol*. 2017;27(5):519–23.
58. Gilligan DM, Lozovatsky L, Gwynn B, Brugnara C, Mohandas N, Peters LL. Targeted disruption of the beta-adducin gene (Add2) causes red blood cell spherocytosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(19):10717–22.
59. Nivaggioni V, Léonnet C, Ebbo M, Grados A, Schleinitz N, Picard V, et al. Multiple splenic infarctions in a malagasy patient with both southeast asian ovalocytosis and a sickle cell trait. *Hématologie*. 2016;7–8(4):284–287.
60. Favaie F, Gardembas M, Pajot O, Saada V, Fénéant-Thibault M, Delaunay J, et al. Southeast Asian ovalocytosis and a sickle cell trait in a young patient with sudden retinal stroke: a fortuitous association? *Hemoglobin*. 2009;33(6):475–9.
61. Ravindranath Y, Goyette G, Johnson R. Southeast Asian ovalocytosis in an African-American family. *Blood*. 1994;84:2823–4.
62. Ma S, Cahalan S, LaMonte G, Grubaugh ND, Zeng W, Murthy SE, et al. Common PIEZO1 allele in African populations causes RBC dehydration and attenuates Plasmodium infection. *Cell*. 2018;173(2):443–55.
63. White JPM, Cibelli M, Urban L, Nilius B, McGeown JG, Nagy I. TRPV4: molecular conductor of a diverse orchestra. *Physiol Rev*. 2016;96(3):911–73.
64. Nilius B, Voets T. The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO Rep*. 2013;14(2):152–63.
65. Mah W, Sonkusare SK, Wang T, Azeddine B, Pupavac M, Carrot-Zhang J, et al. Gain-of-function mutation in TRPV4 identified in patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Med Genet*. 2016;53:705–9.
66. Thibodeau ML, Peters CH, Townsend KN, Shen Y, Henderson G, Adam S, et al. Compound heterozygous TRPV4 mutations in two siblings with a complex phenotype including severe intellectual disability and neuropathy. *Am J Med Genet A*. 2017;173(11):3087–92.
67. Wang Q, Khilan J, Gadue P, Nishikura K. Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science*. 2000;290(5497):1765–8.
68. Lidicoat BJ, Hartner JC, Piskol R, Ramaswami G, Chalk AM, Kingsley PD, et al. Adenosine-to-inosine RNA editing by ADAR1 is essential for normal murine erythropoiesis. *Exp Hematol*. 2016;44(10):947–63.
69. Ansaï O, Shigehara Y, Ito A, Abe R, Shimomura Y. A novel splice site mutation in the ADAR gene leading to exon skipping and dyschromatosis symmetrica hereditaria in a Japanese patient. *Clin Exp Dermatol*. 2016;41(8):933–4.
70. Rice GI, Kitabayashi N, Barth M, Briggs TA, Burton ACE, Carpanelli ML, et al. Genetic, phenotypic, and interferon biomarker status in ADAR1-related neurological disease. *Neuropediatrics*. 2017;48(3):166–84.
71. He Y, Jia S, Dewan RK, Liao N. Novel mutations in patients with hereditary red blood cell membrane disorders using next-generation sequencing. *Gene*. 2017;627:556–62.
72. Seidelmann SB, Smith E, Subrahmanyam L, Dykas D, Ziki MDA, Azari B, et al. The application of whole exome sequencing in the clinical diagnosis and management of inherited cardiovascular diseases in adults. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017;10(11):e001573.
73. Nambot S, Thevenon J, Kuentz P, Duffourd Y, Tisserant E, Bruel AL, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of rare disorders with congenital anomalies and/or intellectual disability: substantial interest of prospective annual reanalysis. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2018;20(6):645–54.
74. Kim Y, Park J, Kim M. Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era. *Blood Res*. 2017;52(2):84.
75. Rets A, Clayton AL, Christensen RD, Agarwal AM. Molecular diagnostic update in hereditary hemolytic anemia and neonatal hyperbilirubinemia. *Int J Lab Hematol*. 2019;41(Suppl. 1):95–101.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.1.1.2 Focus sur les études familiales issues de la figure 2 de l'article 1

Dans l'ensemble des familles étudiées et représentées sur cette figure il y a une co-ségrégation de la mutation avec la maladie, sauf pour la famille P27 où le variant ne co-ségrège pas avec la maladie (Figure 41 sur deux pages).



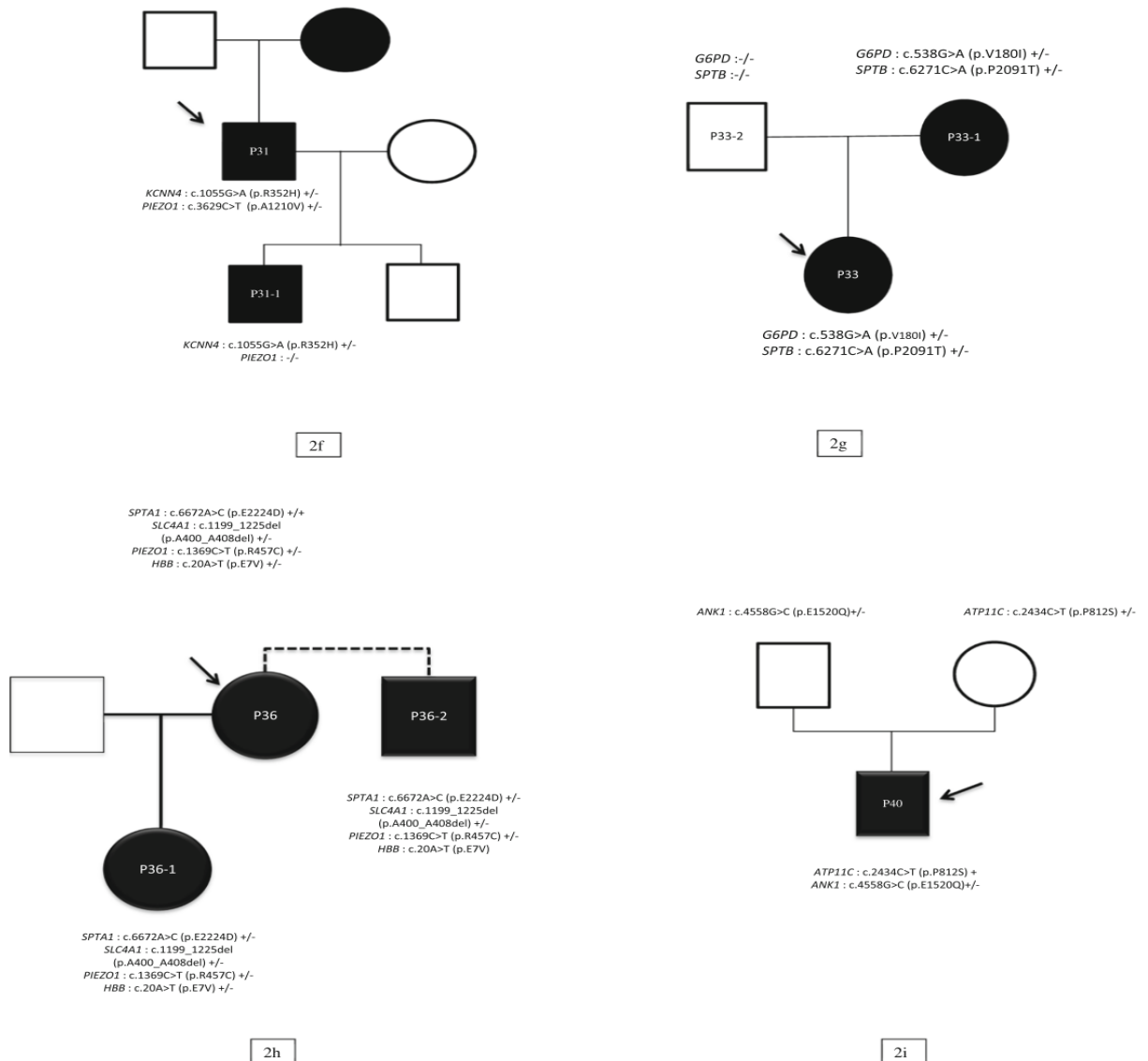


Figure 41 : Arbres généalogiques de 3 familles avec sphérocytose héréditaire et 6 familles avec hémolyse inexpliquée.

Adapté de (Mansour-Hendili et al., 2020)

Les carrés noirs représentent les hommes malades, les ronds noirs représentent les femmes malades, les carrés non colorés représentent les hommes sains, les ronds non colorés représentent les femmes saines, la flèche indique le cas index. 2a = P11 famille SH ; 2b = P10 famille SH ; 2c = P4 famille SH ; 2d = P25 CDA2 ; 2e = P27 hémolyse inexpliquée ; 2f = P31 famille GARDOS = Patient 1 et 1' dans cette thèse ; 2g = P33 hémolyse inexpliquée ; 2h = P36 famille avec de multiples associations ; 2i = P40 Famille avec mutation *ATP11C*

4.1.1.3 Conclusions et discussion article 1

Dans cette étude, le séquençage de l'exome a permis d'identifier une cause génétique chez 33 patients avec AHC sur 40 (82,5%), dont 20 patients SH (100%) et 13 (65%) patients avec hémolyse inexpliquée. Ce travail souligne la grande utilité du séquençage de l'exome dans le diagnostic des AHC permettant d'aboutir à un diagnostic. Dans les cas où les analyses phénotypiques ciblées de première intention n'ont pas réussi à élucider l'origine de la maladie, les tests génétiques et en

particulier le séquençage de l'exome semblent très utiles pour découvrir les défauts génétiques complexes à l'origine de l'AHC et des manifestations associées. Les développements récents des technologies de séquençage exomique ou génomique en font les approches les plus adaptées et les moins chères pour le diagnostic génétique de ces maladies, en gardant à l'esprit la nécessité absolue d'une équipe génétique pluridisciplinaire capable de prendre en charge les découvertes fortuites ou inattendues si nécessaire.

La démocratisation du SHD devrait conduire à mettre à jour les recommandations actuelles concernant la place des tests génétiques dans les AHC. La découverte fréquente de plusieurs mutations dans différents gènes chez un même patient invite également à reconsidérer les bases génétiques des AHC : des maladies apparemment monogéniques peuvent en fait être oligogéniques, avec des variations satellites jouant le rôle de modulateurs du phénotype ou aboutissant à de nouvelles entités cliniques.

Des études mécanistiques plus approfondies sont nécessaires pour mieux comprendre la relation entre génotype et phénotype, en particulier chez les patients présentant une association de variants atypiques ou mal décrites. Cependant, certaines interactions peuvent être difficiles à étudier avec les outils existants. Le développement d'outils phénotypiques de nouvelle génération, tels que la métabolomique et la protéomique des globules rouges, pourrait représenter de nouvelles étapes dans l'exploration des troubles génétiques des globules rouges.

4.1.2 Article 2 : Sphérocytose acquise par mutations ponctuelles *ANK1*

4.1.2.1 Présentation

Cet article décrit une nouvelle entité pathologique mise en évidence par SHD et a été accepté en Avril 2022 par l'American Journal of Hematology (Mansour-Hendili et al., n.d.). Il s'agit d'une sphérocytose acquise par mutation ponctuelle du gène *ANK1* dans le cadre d'une hématopoïèse clonale de signification incertaine (CHIP) chez deux patients non apparentés très âgés (>85 ans). L'hypothèse diagnostique initiale chez ces patients était une anémie hémolytique auto-immune à Test direct à l'antiglobuline négatif (test étendu réalisé IgG, IgM et IgA) devant la présence d'une hémolyse et de nombreux sphérocytes au frottis chez des patients âgés. La réalisation de test EMA et d'ektacytométrie chez ces patients étaient en faveur d'une sphérocytose « héréditaire ». Etant donné le grand âge de ces patients et l'absence d'antécédents familiaux et personnels d'anémie et/ou d'hémolyse nous avons exploré de manière parallèle l'ADN extrait du sang total et de la peau ou des bulbes capillaires de ces patients. Cette approche nous a permis d'avoir deux tissus de deux origines différentes dont un qui n'était pas hématopoïétique afin de confirmer ou d'infirmer le caractère constitutionnel du défaut moléculaire identifié sur le sang ou la moëlle. Cette approche nous a permis de démontrer que les mutations *ANK1* identifiés chez ces deux patients étaient absentes de la peau ou des bulbes capillaires (selon le patient) mettant en évidence le caractère limité au moins au compartiment hématopoïétique de la mutation. Ce processus est sans nul doute plus fréquent que décrit notamment dans la population du 4^{ème} âge liée aux mécanismes de mutations acquises dans des contextes d'évolution à bas bruit de clones hématopoïétiques non malins. 1/3 de la population très âgée porte en effet une CHIP (Rossi et al., 2021).

CORRESPONDENCE

Acquired spherocytosis due to somatic ANK1 mutations as a manifestation of clonal hematopoiesis in elderly patients

To the Editor:

In western countries, the main cause of acquired hemolytic anemia is autoimmune hemolytic anemia (AIHA). A few cases of acquired hemolytic membrane disorders, red blood cell (RBC) enzymatic deficiencies or thalassemia-like acquired syndromes have been described so far. Most of them occurred in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) or myeloproliferative neoplasm (MPN).^{1,2} The most frequent acquired membrane disorder is elliptocytosis associated with del20q in patients with MDS. One case of acquired spherocytosis due to a large deletion encompassing the *SPTB* gene has been described in a 73-year-old patient with MDS, bone marrow karyotype showing complex rearrangements on Chromosomes 5 and 14. Somatic mosaicism for a *G6PD* mutation was found in a 65-year-old patient with acquired *G6PD* deficiency. Acquired alpha-thalassemia (Hemoglobin H disease) has been described in MDS and MPN and is caused by somatic mutations in the *ATRX* gene.

We identified “pseudo-constitutional” somatic mutations of the *ANK1* gene in blood and bone marrow of two unrelated patients who developed hemolytic anemia with spherocytosis at an old age. They were initially considered as having AHAI but had negative direct antiglobulin test (DAT) and did not respond to corticosteroids or immunomodulator treatment.

Patient 1 was a 91-year-old man with no personal or family history of anemia (Figure 1A). He had a history of hypertension and chronic kidney disease. At 85 years of age, he developed regenerative hemolytic anemia with splenomegaly. White blood cells and platelet counts were normal. Blood smear showed numerous spherocytes and no schizocytes (Figure 1B). DAT (with screening for monospecific anti-IgA and IgM antibodies) was negative. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) was ruled out by flow cytometry analysis. Eosin-5'-maleimide (EMA) binding test showed a significant decrease of fluorescence (22%), suggestive of hereditary spherocytosis (HS). The patient was first treated with corticosteroids and then rituximab for a possible DAT-negative AIHA, with no obvious effect on hemoglobin level. Bone marrow aspirate showed an isolated hyperplasia of the erythroid lineage but no features of dysplasia. Bone marrow karyotype was normal. Targeted next-generation sequencing (NGS) of 37 genes involved in MDS or MPN (Table S1) identified a mutation of

DNMT3A (NM_022552): c.2312G>A, p.(Arg771Gln), with a variant allele frequency (VAF) of 48% in blood and 41% in bone marrow. Overall these abnormalities did not lead to the diagnosis of MDS or MPN according to the WHO 2016 classification but rather to a diagnosis of clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP).^{3,4} His risk score for developing myeloid neoplasms as defined by Rossi et al.⁵ was 3 (intermediate risk).

Patient 2 was a 86-year-old man with no family history of hemolytic anemia (Figure 1A). He had an isolated, unexplained macrocytosis discovered at age 65. He developed lung adenocarcinoma at age 69 and was successfully treated by surgical lobectomy and chemotherapy (cisplatin, vinorelbine, gemcitabine and paclitaxel). At age 85, he developed exertional dyspnea, which revealed a regenerative hemolytic anemia. DAT (with screening for anti-IgA and IgM antibodies) was negative, blood smear showed numerous spherocytes and no schizocytes (Figure 1B). There was no PNH clone. Ektacytometry was suggestive of HS but EMA binding test was inconclusive with a fluorescence decrease of only 2%. DAT-negative AIHA was suspected and he received corticosteroids, with no effect. Bone marrow aspirate showed isolated hyperplasia of the erythroid lineage. Targeted NGS found no pathogenic or likely pathogenic variation in 45 genes involved to MDS and MNP (Table S1). Bone marrow karyotype showed loss of Y chromosome and trisomy 15 in all examined mitoses ($n = 19$), leading to the diagnosis of age-related clonal hematopoiesis (CH).

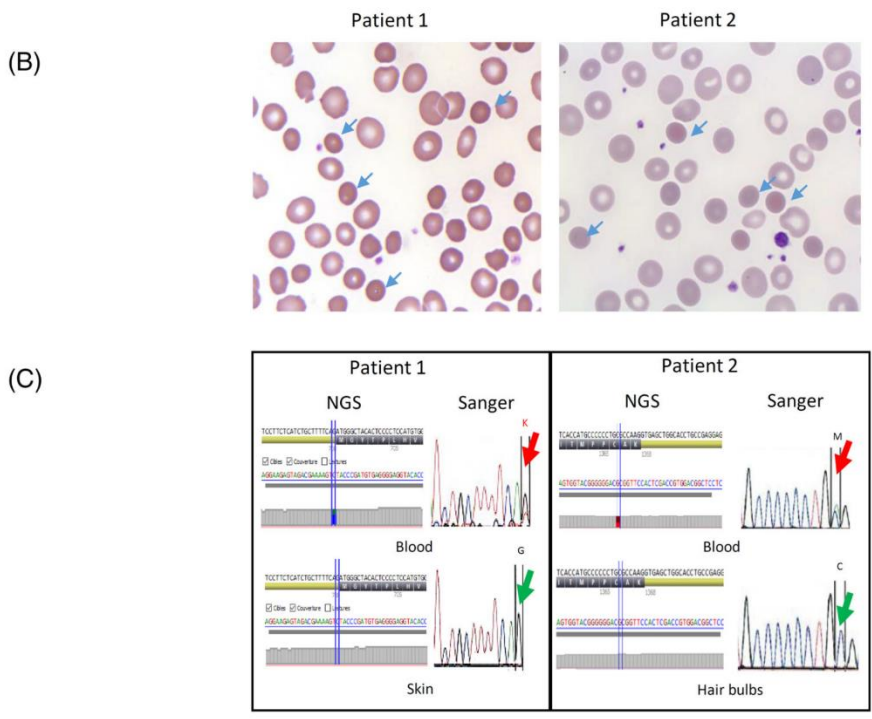
Both patients gave written informed consent for genetic analysis. For the first-line analysis of genes involved in congenital anemia, DNA was extracted from whole blood and NGS analysis was performed using a targeted capture of genes involved in RBC membrane disorders and congenital dyserythropoietic anemia. Genomic DNA from nonhematopoietic tissues was obtained from a skin biopsy in Patient 1 and from hair bulbs in Patient 2. Mutation analysis on non-hematopoietic tissues was performed using NGS and Sanger sequencing (see supplementary methods in Data S1 for extensive description of genetic analyses).

In Patient 1, genetic analysis of blood DNA showed the presence of a new splicing variation in the *ANK1* gene (NM_020476): c.2098-1G>T (depth 439X, VAF 36%). This genotype was compatible with HS. Due to the very late onset of the disease and the absence of family history, we checked for the presence of the variation in another tissue and found that it was absent from DNA extracted from skin, confirming the acquired status of this variation. Exome sequencing on bone marrow DNA confirmed the *DNMT3A* mutation and did not disclose any other mutation in genes involved in CHIP/MDS/MPN. In

Abbreviations: AIHA, autoimmune hemolytic anemia; CH, clonal hematopoiesis; DAT, direct antiglobulin test; EMA, eosin-5'-maleimide; HS, hereditary spherocytosis; MDS, myelodysplastic syndromes; MPN, myeloproliferative neoplasms; PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; NGS, next-generation sequencing; RBC, red blood cell; VAF, variant allele fraction.

(A)	Patient 1	Patient 2
Age at diagnosis	85	85
Medical history and cell blood count	No family history of hemolytic anemia Hb 6.7 g/dL, reticulocyte count $181 \times 10^9/L$, MCV 86.3 fl, platelets $165 \times 10^9/L$, leucocytes $7.32 \times 10^9/L$	No family history of hemolytic anemia Hb 7.7 g/dl, MCV 113 fl, reticulocyte $173 \times 10^9/L$, platelets $205 \times 10^9/L$, leucocytes $4.3 \times 10^9/L$
Direct antiglobulin test (IgG, IgM, IgA)	Negative	Negative (three times)
Others tests: PNH results, Enzymatic RBC activity values and hemoglobin study, haptoglobin	Absence of PNH clone Enzymatic RBC activity values and hemoglobin study: normal Haptoglobin: undetectable	Absence of PNH clone Enzymatic RBC activity values and hemoglobin study: normal Haptoglobin: undetectable
EMA test and ektacytometry	EMA: -22% Ektacytometry showing an abnormal profile in a context of transfusion	EMA: -2% Ektacytometry suggestive of hereditary spherocytosis
Blood smear evaluation	Numerous spherocytes, no schizocytes	Numerous spherocytes, no schizocytes
Bone marrow aspirate	Rich sample with many megakaryocytes, without blasts excess. Erythroid lineage hyperplasia with qualitative abnormalities (Jolly bodies, dystrophic nucleus), presence of some multinucleated erythroblasts and some giant erythroblasts. Insufficient diagnostic features for a myelodysplastic syndrome according to WHO 2016 classification.	Two times Rich bone marrow, polymorphic, without any abnormalities, hyperplasia of red blood cell lineage, discrete and unspecific signs of dyserythropoiesis without any other abnormalities
Medullary karyotype after myeloid culture	46,XY [22] Absence of acquired clonal abnormality in the analyzed metaphases	Loss of Y chromosome and trisomy 15 in all examined mitoses [19]
NGS panel for MDS/MPN in blood and bone marrow	<i>DNMT3A</i> (NM_022552): c.2312G>A p.(Arg771Gln) likely pathogenic Depth 1211X; VAF 48% in blood Depth 1572X; VAF 41% in bone marrow	No abnormality in explored genes
NGS panel for RBC membrane disorders on blood DNA	<i>ANK1</i> (NM_020476): c.2098-1G>T Depth 439X; VAF 36%	<i>ANK1</i> (NM_020476): c.4098C>A p.(Cys1366*) Depth 405X; VAF 41%
Whole exome sequencing	<i>DNMT3A</i> (NM_022552): c.2312G>A p.(Arg771Gln) likely pathogenic Depth 169X; VAF 40% in bone marrow <i>ANK1</i> (NM_020476): c.2098-1G>T Depth 173X; VAF 32% in bone marrow	<i>ATM</i> (NM_000051): c.9023G>A p.(Arg3008His), likely pathogenic Depth 175X; VAF 31% in bone marrow Depth 238X; VAF 0.00% in hair bulb <i>ANKRD11</i> (NM_013275): c.5102C>G, p.(Thr1701Ser), variant of unknown significance Depth 62X; VAF 42% in bone marrow Depth 125X; VAF: 0.00% in hair bulb <i>ANK1</i> (NM_020476): c.4098C>A p.(Cys1366*) Depth 107X; VAF 48% in bone marrow
Treatment and outcome	Corticosteroids and rituximab ineffective Several transfusions, EPO	Corticosteroids ineffective Transfusions Now only EPO

FIGURE 1 (A) Clinical and biological data for Patients 1 and 2. (B) Blood smears of Patients 1 and 2, stained with May Grumwald Giemsa ($\times 1000$), showing numerous spherocytes in both patients (blue arrows). (C) Sequencing results. In Patient 1, presence of the *ANK1* mutation (c.2098-1G>T, VAF 36% by NGS analysis) in blood DNA, absence in skin DNA; in Patient 2, presence of the *ANK1* mutation (c.4098C>A, p.(Cys1366*), VAF 41% by NGS analysis) in blood DNA, absence in hair bulbs DNA. EMA, eosin-5'-maleimide; EPO, erythropoietin; MDS, myelodysplastic syndromes; MPN, myeloproliferative neoplasms; NGS, next-generation sequencing; PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; RBC, red blood cell; VAF, variant allelic fraction



bone marrow, VAF was 32% for the *ANK1* mutation (depth 173X) and 40% for the *DNMT3A* mutation (depth 169X). This suggests that the clone harboring the *DNMT3A* mutation represents 80% of the hematopoietic cells (assuming that the *DNMT3A* mutation is present at the heterozygous state in all clonal cells, as previously reported in most patients⁶), and that a large majority of cells in this clone harbor the *ANK1* mutation (32/40 = 80%). The fact that the *ANK1* mutation has a lower VAF than the *DNMT3A* mutation suggests that the *ANK1* “passenger” mutation occurred later during clone development.

In Patient 2, genetic analysis of blood DNA showed the presence of a new nonsense variation in the *ANK1* gene (NM_020476): c.4098C>A; p.(Cys1366*) (depth 405X, VAF 41%). Again, we checked for the presence of the mutation on another tissue and found that it was absent from DNA extracted from hair bulbs, confirming that it was a somatic mutation. In bone marrow, VAF was 48% for the *ANK1* mutation (depth 107X). Since the patient clearly had CH but no driver mutation identified by targeted NGS, we extended the genetic testing and performed comparative exome sequencing on bone marrow and hair bulb DNA. We found two acquired somatic variations in bone marrow: c.9023G>A p.(Arg3008His) in *ATM* (NM_000051, VAF: 31%, depth 175X) and c.5102C>G, p.(Thr1701Ser) in *ANKRD11* (NM_013275, VAF 42%, depth 62X). Both variations are candidate driver mutations of CH in this patient, but with uncertainty about their causal role. *ATM* has been involved in therapy-related CH in patients with nonhematologic cancers.⁷ In addition, the c.9023G>A p.(Arg3008His) variation is known to be pathogenic. However, with a VAF of 31%, it is present in only 31/48 = 65% of clonal cells harboring the *ANK1* mutation. *ANKRD11* is a co-activator of p53⁸ and considered as an actionable cancer target but it has never been involved in CH pathogenesis.⁷ In elderly patients, Zink et al. found that no more than 40% of cases of age-related CH (identified by whole genome sequencing) could be accounted for by a candidate driver mutation. They suggested that age-related CH could also result from epigenetic changes or even from neutral drift.⁹

Genetic analysis of DNA from different tissues allowed us to discover acquired *ANK1* mutations in bone marrow and blood. The VAFs of these mutations in blood were high and compatible with a hereditary disorder (36% and 41%) because both patients had an age-related CH in which the clonal cell population had become predominant. The presence of an *ANK1* mutation in most of the clonal cells led to the production of high levels of spherocytes, with hemolytic anemia as a consequence. Our findings demonstrate that hematopoietic clones can harbor additional “passenger” mutations with detrimental effects, leading to the phenocopy of a hereditary disorder like HS when the clone becomes predominant.

Warm AIHA is a classical cause of spherocytic anemia. DAT-negative AIHA was first suspected in both patients but both failed to respond to corticosteroids (and rituximab for Patient 1). DAT is reported to be negative in approximately 5% of patients with AIHA¹⁰ but making the diagnosis of DAT-negative AIHA requires to have ruled out other causes of hemolytic anemia (such as PNH, microangiopathy or drug-induced HA and so on). RBC membrane disorders due to somatic mutations in genes encoding membrane proteins are new diagnoses to consider in elderly people with unexplained,

DAT-negative spherocytic anemia. The patients have given their consent to genetic explorations and research use of their samples.

AUTHOR CONTRIBUTIONS




Lamisse Mansour-Hendili, Frédéric Galactéros, and Benoît Funalot conceived the study, analyzed data, and wrote the manuscript. Edouard Flamarion, Marc Michel, Caroline Morbieu, Bertrand Godeau, Marion Camard, and Loïc Garçon provided patient care, generated clinical data, and revised the manuscript. Christine Gameiro performed NGS experiments and analysis. Ivan Sloma, Sihem Tarfi, Chloé Friedrich, and Olivier Kosmider performed NGS analysis. Bouchra Badaoui, Luc Darnige, and Véronique Picard performed hematological experiments and analysis. Ariane Lunati-Rozie revised the manuscript. Abdelrazak Aissat performed bioinformatic analysis. Nasséra Abermil, Sophie Kaltenbach, and Isabelle Radford-Weiss performed and validated cytogenetic analysis. Pascale Fanen and Pablo Bartolucci revised the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data available on request from the authors

Lamisse Mansour-Hendili^{1,2} , Edouard Flamarion³, Marc Michel^{4,5},
Caroline Morbieu^{4,5}, Christine Gameiro¹, Ivan Sloma^{5,6},
Bouchra Badaoui⁶, Luc Darnige⁷, Marion Camard³, Ariane Lunati-
Rozie^{1,5} , Abdelrazak Aissat^{1,5}, Sihem Tarfi^{5,6}, Chloé Friedrich⁸,
Véronique Picard⁹, Loïc Garçon^{10,11,12} , Nasséra Abermil^{13,14},
Sophie Kaltenbach¹⁵, Isabelle Radford-Weiss¹⁵, Olivier Kosmider⁸,
Pascale Fanen^{1,5}, Pablo Bartolucci^{2,16}, Bertrand Godeau^{4,5},
Frédéric Galactéros^{2,16}, Benoît Funalot^{1,5}

¹Département de Biochimie-Biologie Moléculaire, Pharmacologie, Génétique Médicale, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France

²Université Paris-Est Créteil, IMRB Equipe Pirenne, Laboratoire d'excellence LABEX GRex, Créteil, France

³Service de Médecine Interne, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Centre-Université Paris Cité, Paris, France

⁴Service de Médecine Interne, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France

⁵Université Paris-Est Créteil, INSERM, IMRB, Créteil, France

⁶Département d'Hématologie et d'Immunologie, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France

⁷Département d'Hématologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Centre-Université Paris Cité, Paris, France

⁸Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Cochin, AP-HP, Centre-Université Paris Cité, Paris, France

⁹Département d'Hématologie Biologique, Hôpital Bicêtre, AP-HP, Université Paris Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

¹⁰Laboratoire Hématopoïèse et Immunologie (HEMATIM) EA4666, Université Picardie Jules Verne, Amiens, France

¹¹Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France

¹²Service de Génétique Constitutionnelle, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France

¹³Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université, Inserm, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

¹⁴Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Sorbonne Université, Paris, France

¹⁵Service de Cytogénétique, Hôpital Necker enfants malades, AP-HP, Centre-Université Paris Cité, Paris, France

¹⁶Red Cell Disease Referral Center—UMGGR, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France

Correspondence

Lamisse Mansour-Hendili, Département de Biochimie-Biologie Moléculaire, Pharmacologie, Génétique Médicale, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, 51 Avenue du Maréchal de Lattre De Tassigny, F-94010 Créteil, France.
Email: lamisse.mansour-hendili@aphp.fr

ORCID

Lamisse Mansour-Hendili  <https://orcid.org/0000-0001-7887-9156>

Ariane Lunati-Rozie  <https://orcid.org/0000-0002-8425-431X>

Loïc Garçon  <https://orcid.org/0000-0002-4002-2461>

REFERENCES

1. Fraiman YS, Moliterno AR. High-density genomic analysis reveals basis of spherocytosis in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2015; 125(22):3517. doi:10.1182/blood-2014-12-617142

2. Manthri S, Vasireddy NK, Bandaru S, Pathak S. Acquired elliptocytosis as a manifestation of myelodysplastic syndrome associated with deletion of chromosome 20q. *Case Rep Hematol*. 2018;2018:6819172. doi:10.1155/2018/6819172
3. Hong M, He G. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myelodysplastic syndromes. *J Transl Int Med*. 2017; 5(3):139-143. doi:10.1515/jtim-2017-0002
4. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9-16. doi:10.1182/blood-2015-03-631747
5. Rossi M, Meggendorfer M, Zampini M, et al. Clinical relevance of clonal hematopoiesis in persons aged ≥80 years. *Blood*. 2021;138(21):2093-2105. doi:10.1182/blood.2021011320
6. Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011;25(7):1153-1158. doi:10.1038/leu.2011.44
7. Coombs CC, Zehir A, Devlin SM, et al. Therapy-related clonal hematopoiesis in patients with non-hematologic cancers is common and associated with adverse clinical outcomes. *Cell Stem Cell*. 2017;21(3):374-382.e4. doi:10.1016/j.stem.2017.07.010
8. Neilsen PM, Cheney KM, Li CW, et al. Identification of ANKRD11 as a p53 coactivator. *J Cell Sci*. 2008;121(21):3541-3552. doi:10.1242/jcs.026351
9. Zink F, Stacey SN, Norrdahl GL, et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood*. 2017;130(6):742-752. doi:10.1182/blood-2017-02-769869
10. Segel GB, Lichtman MA. Direct antiglobulin ("Coombs") test-negative autoimmune hemolytic anemia: a review. *Blood Cells Mol Dis*. 2014; 52(4):152-160. doi:10.1016/j.bcmd.2013.12.003

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

Supplementary Methods

For analysis of genes involved in MDS/MPN, genomic DNA was extracted from whole blood and bone marrow aspirate using the QIA Symphony extractor (Qiagen) in patient 1 and Maxwell 16 Blood DNA kit (Promega) in patient 2. For analysis of genes involved in congenital anemia, genomic DNA was extracted from blood using FlexiGene DNA kit (Qiagen) in patient 1 and Maxwell RSC Whole Blood DNA kit (Promega) in patient 2. Genomic DNA was extracted from skin biopsy using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) in patient 1 and from hair bulbs using Maxwell RSC Tissue DNA kit (Promega) in patient 2.

In patient 1, NGS of genes involved in MDS/MPN was performed using Agilent capture and sequenced on a MiSeq system (Illumina) according to manufacturer's recommendations. Bioinformatic analysis was performed using an institutional platform of analysis named *serveur AP-HP G-route Pipeline SCIP 3.3.4*.

In patient 2, NGS of genes involved in MDS/MPN was performed using an Ampliseq custom panel and sequenced on an Ion Torrent S5XL system (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's recommendations. Bioinformatic analysis was performed using NextGENe software (SoftGenetics) and an in-house pipeline (Polydiag, Institut Imagine, Université Paris Cité).

In both patients, NGS of RBC membrane disorders and CDA was performed using KAPA Hyperchoice Max 3Mb T3 enrichment probes (Roche). Sequencing was performed on a MiSeq system (Illumina) according to manufacturer's recommendations. Bioinformatic analysis was performed using a BWA/GATK best practices pipeline and the SeqNext software (JSI). Variants with VAF under 20% in the patients' samples were rejected as well as variants with MAF above 5% in the gnomAD database (<https://gnomad.broadinstitute.org>). Variants were classified according to the ACMG criteria (Richards *et al* 2015).

Whole exome sequencing was performed using KAPA HyperExome enrichment probes (Roche). Sequencing was performed on a Nextseq 500 system (Illumina). Bioinformatic analysis were performed using Sophia DDM (Sophia Genetics) softwares and a local pipeline based on BWA/GATK best practices. NGS reads (.bam files) visualization was performed using AlamutVisual (Sophia Genetics). In patient 2, we searched for *de novo* variations in bone marrow DNA compared to hair bulb DNA. We only focused on variations classified as pathogenic or likely pathogenic following ACMG classification.

Sanger sequencing of *ANK1* exons 19 and 33 and flanking regions was performed on genomic DNA extracted from blood, bone marrow, hair bulbs and skin biopsy (details available upon request).

Supplementary table 1: Genes analyzed in the NGS panels: A: NGS Panel for RBC membrane disorders and CDA ; B: NGS Panel for MDS/MPN used in Patient 1; C: NGS Panel for MDS/MPN used in Patient 2; D: MDS/MPN genes analyzed on exome data from patients 1 and 2 (based on Gibson *et al* 2017, Zink *et al* 2017, Awada *et al*, 2020 and Liquori *et al*, 2021)

A	B	C	D
<i>ANK1</i>	ABL1	ASXL1	ABL1
<i>SPTB</i>	ASXL1	BCOR	AKT3
<i>SPTA1</i>	ASXL2	BCORL1	ACSS2
<i>SLC4A1</i>	BRAF	BRAF	AKAP17A
<i>EPB42</i>	CALR	CALR	ANKRD26
<i>EPB41</i>	CBL	CBL	ASXL1
<i>PIEZO1</i>	CEBPA	CSF3R	ASXL2
<i>KCNN4</i>	CSF3R	CSNK1A1	ATM
<i>STOM</i>	DNMT3A	CUX1	BCOR
<i>RHAG</i>	ETNK1	DDX41	BCORL1
<i>RHCE</i>	ETV6	ETNK1	BRAF
<i>ABCG5</i>	EZH2	DNMT3A	CALR
<i>ABCG8</i>	FLT3	ETV6	CBL
<i>LCAT</i>	GATA2	EZH2	CEBPA
<i>ATP11C</i>	HRAS	FLT3	CEP112
<i>XK</i>	IDH1	GATA2	CREBBP
<i>GATA1</i>	IDH2	HRAS	CSF3R
<i>HBB</i>	JAK2	IDH1	CSNK1A1
<i>HBA1</i>	KIT	IDH2	CUX1
<i>HBA2</i>	KRAS	JAK2	DDX41
<i>CDAN1</i>	MPL	KDM6A	DNMT3A
<i>C15ORF41</i>	NPM1	KIT	ETNK1
<i>SEC23B</i>	NRAS	KRAS	ETV6
<i>KIF23</i>	PPM1D	MPL	EVI2A
<i>GOL</i>	RAD21	MYD88	EZH2
<i>KLF1</i>	RUNX1	NRAS	FLT3
<i>PARP4</i>	SETBP1	PHF6	GATA2
<i>ALAS2</i>	SF3B1	PPM1D	GOLGA8B
<i>GLRX5</i>	SH2B3	PTEN	GNAS
<i>ABCB7</i>	SMC3	PTPN11	GNB1
	SRSF2	RAD21	HRAS
	STAG2	RHOA	HRC
	TET2	RIT1	IDH1
	TP53	RUNX1	IDH2
	U2AF1	SETBP1	JAK2

	Wt1	SF3B1	KDM6A
	ZRSR2	SH2B3	KMT2D
		SRSF2	KIT
		STAG2	KRAS
		STAT3	MLL2
		TET2	MLL3
		TP53	MPL
		U2AF1	MTA2
		WT1	MYD88
		ZRSR2	NF1
			NPM1
			NRAS
			PHF6
			PI3KCD
			PLCG2
			PPM1D
			PRKCG
			PTEN
			PTPN11
			RAD21
			RHOA
			ROBO1
			RTK
			RTT1
			RUNX1
			SAMD9
			SAMD9L
			SETBP1
			SETD2
			SETDB1
			SF3B1
			SH2B3
			SMC1A
			SMC3
			SRSF2
			STAG2
			STAT3
			TERC
			TET2
			TP53
			U2AF1
			UMODL1

			WT1
			ZNF318
			ZRSR2

4.1.2.2 Conclusions et discussion de l'article 2

L'analyse génétique de l'ADN issu de différents tissus nous a permis de mettre en évidence des mutations acquises du gène *ANK1* restreintes à la moëlle osseuse et au sang. Les VAF de ces mutations dans le sang sont élevées et compatibles avec une maladie héréditaire (36 % et 41 %). Les deux patients ont une hématopoïèse clonale liée à l'âge dans laquelle la population de cellules clonales est devenue prédominante. La présence d'une mutation *ANK1* dans la plupart des cellules clonales a conduit à la production de niveaux élevés de sphérocytes, avec pour conséquence une anémie hémolytique. Nos résultats démontrent que les clones hématopoïétiques peuvent héberger des mutations «passagères» supplémentaires avec des effets néfastes, conduisant à des phénocopies de maladies génétiques connues comme la sphérocytose héréditaire lorsque le clone devient prédominant.

Une AHAI à test direct à l'antiglobuline (TDA) négatif a d'abord été suspectée chez les deux patients présentés, mais aucun des deux n'a répondu aux corticostéroïdes (et au rituximab pour le patient 1). Le TDA est rapporté comme négatif chez environ 5% des patients atteints d'AHAI. Cependant, poser le diagnostic d'AHAI à TDA négatif nécessite d'avoir exclu d'autres causes d'anémie hémolytique comme l'HPN, la microangiopathie ou l'anémie hémolytique d'origine médicamenteuse et les pathologies de membrane acquises comme le démontre ces cas notamment chez les personnes âgées dans un contexte d'hématopoïèse clonale.

4.1.3 Article 3 : Résolution d'un cas syndromique d'AHC via séquençage très haut débit

4.1.3.1 Présentation

Le déploiement du Plan France médecine génomique 2025 à visée diagnostique dans les maladies rares a permis depuis 2020 via la pré-indication « maladies constitutionnelles du GR » d'inclure des patients en errance diagnostique en séquençage de type *whole genome sequencing*. Un cas pédiatrique en errance diagnostique (Lunati et al., 2021) a pu grâce au séquençage de génome entier aboutir à un diagnostic. Il s'agit d'une mutation *de novo* dans le cadre d'une nouvelle maladie qui n'était pas encore officiellement décrite au moment de l'analyse du génome. Seules des descriptions lors de congrès avaient été effectuées et les articles étaient en cours de révision. Nous avons donc publié de manière quasi simultanée avec les deux équipes ayant les premières décrit ce nouveau syndrome associant une dysérythropoïèse congénitale et une malformation cérébrale sévère avec un retard développemental associé.

hemoglobin phenotype in African Americans. *Am J Hematol.* 2012;87:217-219.

9. Taylor JG 6th, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS One.* 2008;3:e2095.
10. Nouraie M, Lee JS, Zhang Y, et al. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica.* 2013;98:464-472.

Received: 16 December 2020 | Revised: 12 January 2021 | Accepted: 14 January 2021

DOI: 10.1002/ajh.26099

VPS4A mutation in syndromic congenital hemolytic anemia without obvious signs of dyserythropoiesis

To the Editor:

Very recently, two research groups described a new neurodevelopmental syndrome with hematologic impairment, caused by de novo dominant mutations in the VPS4A gene.^{1,2} Seu et al. focused on three cases characterized by Congenital Dyserythropoietic Anemia (CDA) associated with a severe neurodevelopmental disorder (global developmental delay with microcephaly, retinal dystrophy and cerebellar hypoplasia; ref.² Rodger et al. focused on the neurodevelopmental disorder whereas hematological parameters were not extensively described.¹ The VPS4A protein is a vacuolar ATPase involved in reticulocyte maturation through exosome biogenesis.³

We have independently identified another patient harboring a pathogenic VPS4A mutation. This child had a neurodevelopmental disorder and severe hemolytic anemia but no overt sign of dyserythropoiesis, which suggests that the hematological phenotype of VPS4A-related anemia could be more extended and that the diagnosis should not only be considered in patients with typical CDA.

The patient was a three-year-old boy, born at term following an uncomplicated pregnancy. He was the first child of healthy unrelated parents, aged 33 (father) and 25 (mother) at the time of birth. At birth, he presented with hemolytic non-immune anemia with hemoglobin (Hb) level 92 g/L. He received transfusion at birth and became transfusion dependent (Hb 65 g/L at one month of age, before the second transfusion). Membrane and enzyme red blood cells (RBC) tests were normal before transfusions. Reticulocyte counts were always remarkably high (200 G/L to 700 G/L, 500 G/L on average) suggesting high regeneration. At 9 months of age (two months after a transfusion), the Hb level was 88 g/L; MCV, 96 fL; reticulocyte count, 461 G/L; haptoglobin level, 0.3 g/L (reference range: 0.47–1.25 g/L); LDH 892 U/L (550–1100 U/L).

Serum ferritin level was 241 µg/L (10–80 µg/L); transferrin level, 1.63 g/L (2.13–3.39 g/L); serum iron level, 29.4 µmol/L (12–30 µmol/L); transferrin saturation, 72% (20%–40%). The bone marrow responsiveness index (BMRI), as defined by Russo et al.,⁴ was very high at 495. The patient experienced a transient peripheral thrombopenia during an episode of myositis of the left arm. Blood smear evaluation was always subnormal with non-specific anisopoikilocytosis depending on time since last transfusion. Myelogram at 3 years of age showed an erythroblastic lineage hyperplasia with balanced maturation. Results were considered as subnormal with no mention of cytologic stigma of CDA. Secondly, we reexamined the myelogram after the VPS4A mutation had been identified. We found very few signs of dyserythropoiesis, mainly on acidophilic precursors (irregular nuclear outline, basophilic stippling, presence of a few binucleated elements without any nuclear asymmetry, rare macrocytic erythroblasts; Figure 1(A)). No interchromatinian bridges, multinucleated elements or giant erythroblasts were found. Perls coloration did not reveal any ring sideroblast.

Regarding neurodevelopment, the patient was hypotonic at birth and had no head control at 3 months of age. At 6 months, he presented with axial hypotonia, peripheral hypertonia, no ocular pursuit and microcephaly at –2.5 SD. At the last examination (3 years of age) he had severe axial hypotonia and choreodystonic movements with facial dyskinesia. Brain MRI at 2 years of age showed cerebral atrophy, thin dysplastic corpus callosum, basal ganglia atrophy, brainstem hypoplasia, cerebellar hypoplasia and dysplasia (Figure 1(B)). There was also a marked and diffuse widening of the diploic space of frontal calvarial bones with thickening and abnormal signal intensity of the bony structures of the cranial base, indicating a very high proliferative hematopoiesis in skull bone marrow, as described in chronic hemolytic anemia or ineffective erythropoiesis.⁵ Electroretinogram disclosed global bilateral retinal dysfunction suggestive of Leber congenital amaurosis. Bilateral cataracts appeared at 3 years of age. Metabolic and constitutional cytogenetic analyses were normal.

Thanks to the national France Genomic Medicine 2025 (FMG2025) plan, the patient and his parents underwent Whole Genome Sequencing (WGS) with trio analysis. The proband was found to harbor a de novo heterozygous mutation in the VPS4A gene: c.850 A>T (p.R284W). The same mutation had previously been found in five out of nine identified patients with VPS4A-related disorder.^{1,2} Functional testing of the p.R284W variant had been performed, showing a deleterious effect of mutated VPS4A protein on endosomal trafficking, formation of centrosome, primary cilium morphology and regulation of cell cycle in patients' fibroblasts and red blood cells.^{1,2}

In our patient, the absence of obvious cytologic signs of CDA in bone marrow contrasts with the hematological findings in patients described by Seu et al., including one with the same mutation, which all had clear CDA.¹ This discrepancy could be due in part to the fact that patients reported by Seu et al. were included through the congenital dyserythropoietic anemia registry for North America (CDAR).

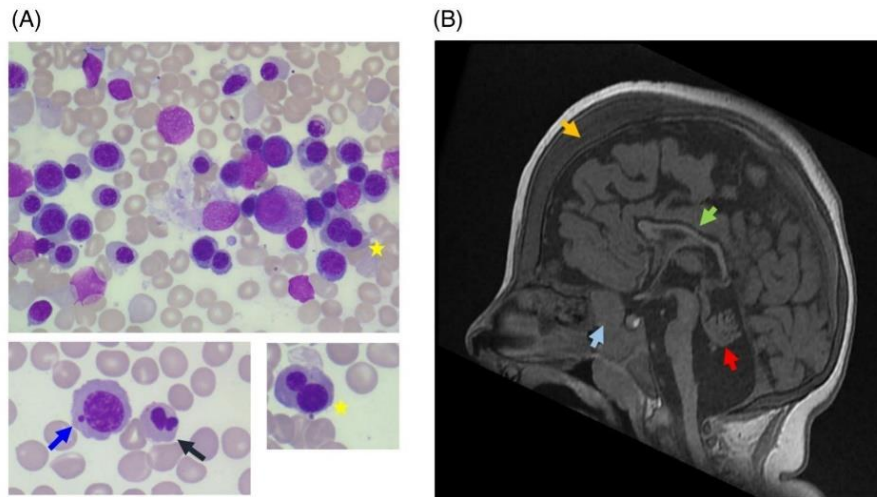


FIGURE 1 (A) Bone marrow study of the patient, showing an erythroblastic lineage hyperplasia with mild macrocytosis (top left) and no obvious signs of congenital dyserythropoiesis except very few binucleated elements (yellow star), irregular nuclear outline (black arrow) and cytoplasmic inclusion (blue arrow). (B) T1-weighted midsagittal MRI image, showing brainstem hypoplasia, cerebellar vermis hypoplasia and dysplasia (red arrow), thin and dysplastic corpus callosum (green arrow). The diploic space of the frontal calvarial vault is markedly thickened and hypointense (yellow arrow) and the base of the skull displays abnormal signal hypointensity (blue arrow) in relation with high proliferative hematopoiesis

In our patient, the association of a very high reticulocyte level, a very high BMRI and few signs of dyserythropoiesis in bone marrow suggests that reticulocyte maturation (autophagic organelle clearance and ubiquitin proteasome-mediated proteolysis) might be the most impaired step of terminal erythropoiesis. Indeed, VPS4 is an indispensable partner of the ESCRT III complex,^{1,2} which has been shown to regulate reticulocyte proteome remodeling and organelle clearance.⁶ In any case, the absence of specific signs of dyserythropoiesis on bone marrow in our patient does not allow classifying his anemia as classical CDA. In addition, bone marrow morphological abnormalities are not specific to CDAs and can be found in various hereditary anemias that involve erythropoietic stress.⁷

It is intriguing that, among the 10 currently identified patients with VPS4A mutations, six (including the present report) harbored the same c.850A>T (p.R284W) mutation. Recurrence of this de novo mutation in several patients from different families and origins may suggest a mutational “hot spot”. Frequent mechanisms involved in de novo recurrent mutations include high paternal age at conception and gain-of-function mutations conferring a selective advantage in spermatogonia. A>T transversions are very rare among de novo mutations, compared to C>G transversions and to transitions, which represent the most frequent type of de novo point mutations.⁸ In our case, neither paternal age at conception nor selective advantage in spermatogenesis seem to be responsible for the outcome of this mutation, even if VPS4A has an important role in human acrosome genesis.⁹

In conclusion, we would like to emphasize the fact that the diagnosis of VPS4A-related disorder should be considered in patients with congenital hemolytic anemia associated to severe

neurodevelopmental disorder, even in the absence of overt signs of dyserythropoiesis. The exact phenotypic spectrum of this disorder will be clarified as new cases are described.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Bouchra Badaoui for her help in the preparation of the manuscript. This work was supported in part by the French Ministry of Health and the French Ministry of Higher Education and Research (Plan France Médecine génomique 2025).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ariane Lunati^{1,2} , Arnaud Petit³ , Hélène Lapillonne⁴,
Christine Gameiro¹, Virginie Saillour⁵, Catherine Garel⁶,
Diane Doummar⁷, Leila Qebibo⁸, Abdelrazak Aissat^{1,2},
Pascale Fanen^{1,2}, Pablo Bartolucci^{9,10}, Frédéric Galact eros^{9,10},
Benoit Funalot^{1,2,5}, Lydie Burglen^{5,8,11}, Lamisse Mansour-
Hendili^{1,5,10} 

¹D epartement de Génétique, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France

²Universit  Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Créteil, France

³Sorbonne Université, AP-HP, Hôpital Trousseau, Service d'hématologie et d'oncologie pédiatrique, Paris, France

- ⁴Service d'hématologie biologique, AP-HP, Hôpital Trousseau, Paris, France
- ⁵Laboratoire de biologie médicale multisites Sequoia – FMG2025, Paris, France
- ⁶Service de Radiologie, APHP, Hôpital Trousseau, Paris, France
- ⁷Sorbonne Université, Service de Neuropédiatrie, centre de référence neurogénétique, AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, Fédération Universitaire I2D2, Paris, France
- ⁸Centre de Référence des Malformations et Maladies Congénitales du Cervelet, Département de Génétique, AP-HP, Sorbonne Université, Hôpital Trousseau, Paris, France
- ⁹Sickle Cell Referral Center – UMGG, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France
- ¹⁰Université Paris Est Créteil, IMRB Equipe Pirene, Laboratoire d'excellence LABEX GRex, Créteil, France
- ¹¹Developmental Brain Disorders Laboratory, Institut Imagine, INSERM UMR 1163, Paris, France
6. Liu Y, Mei Y, Han X, et al. Membrane skeleton modulates erythroid proteome remodeling and organelle clearance. *Blood*. 2020;137:398-409.
7. Iolascon A, Andolfo I, Russo R. Congenital dyserythropoietic anemias. *Blood*. 2020;136:1274-1283.
8. Acuna-Hidalgo R, Veltman JA, Hoischen A. New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. *Genome Biol*. 2016;17:241.
9. Pocognoni CA, Berberian MV, Mayorga LS. ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) machinery is essential for Acrosomal exocytosis in human sperm. *Biol Reprod*. 2015;93:124.

Received: 8 January 2021	Revised: 14 January 2021	Accepted: 17 January 2021
--------------------------	--------------------------	---------------------------

DOI: 10.1002/ajh.26103

Survival of patients with marginal zone lymphoma in the United States: A population-based cohort study (2000 to 2017)

Correspondence

Ariane Lunati and Lamisse Mansour-Hendili, Département de Génétique, Hôpital Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre De Tassigny, F-94010 Créteil, France.
Email: ariane.lunati-rozie@aphp.fr and lamisse.mansour-hendili@aphp.fr

Lydie Burglen and Lamisse Mansour-Hendili are co-senior authors.

Abbreviations: BMRI, Bone marrow responsiveness index; CDA, congenital dyserythropoietic anemia; Hb, hemoglobin; MCV, Mean Corpuscular Volume; RBC, red blood cell.

ORCID

Ariane Lunati  <https://orcid.org/0000-0002-8425-431X>

Arnaud Petit  <https://orcid.org/0000-0001-8363-1622>

Lamisse Mansour-Hendili  <https://orcid.org/0000-0001-7887-9156>

REFERENCES

- Rodger C, Flex E, Allison RJ, et al. De novo VPS4A mutations cause multisystem disease with abnormal neurodevelopment. *Am J Hum Genet*. 2020;107:1129-1148.
- Seu KG, Trump LR, Emberesh S, et al. VPS4A mutations in humans cause syndromic congenital Dyserythropoietic anemia due to cytokinesis and trafficking defects. *Am J Hum Genet*. 2020;107:1149-1156.
- Carayon K, Chaoui K, Ronzier E, et al. Proteolipidic composition of Exosomes changes during reticulocyte maturation. *J Biol Chem*. 2011; 286:34426-34439.
- Russo R, Gambale A, Langella C, Andolfo I, Unal S, Iolascon A. Retrospective cohort study of 205 cases with congenital dyserythropoietic anemia type II: definition of clinical and molecular spectrum and identification of new diagnostic scores. *Am J Hematol*. 2014;89:E169-E175.
- Eskazan AE, Ar MC, Baslar Z. Intracranial extramedullary hematopoiesis in patients with thalassemia: a case report and review of the literature. *Transfusion*. 2012;52:1715-1720.

To the Editor:

Marginal zone lymphoma (MZL) is an indolent Non-Hodgkin lymphoma (NHL) that originates from the marginal zone of B-cell follicles. Treatment of MZL has advanced over the past two decades. In the early 2000s, the use of rituximab for MZL improved the outcomes of both treatment-naïve and refractory patients.¹ Rituximab was subsequently adopted alone or in combination with chemotherapy for the treatment of MZL. In the mid-2000s, bendamustine-rituximab (BR) was studied in indolent NHLs and was found to be non-inferior to rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone with a better toxicity profile.² In the early 2010s, several other regimens showed promising results including chlorambucil and rituximab, and novel agents such as ibrutinib, idelalisib, and lenalidomide (alone or in combination with rituximab). Despite the advances in treatment for MZL, there are limited data showing improvement in outcomes at the population level in the US. Hence, we sought to determine whether the disease-related survival of patients with MZL improved at the population level using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database. We hypothesized that patients with MZL diagnosed during the most recent period were less likely to die from their disease.

The SEER-18 database includes data from 18 state and local cancer registries. We included adults aged 18–84 years who were diagnosed with MZL between 2000–2017. MZL cases were identified using the third edition of the International Classification of Disease for Oncology histology codes 9689, 9699, 9760, and 9764. The primary outcome was relative survival (RS). Secondary outcomes

4.1.3.2 Résultat et discussion article 3

Ce cas met en reflet l'intérêt du STHD de type WGS dans les pathologies congénitales du GR notamment dans les cas pédiatriques de découverte néonatale et syndromiques en errance diagnostique. Par ailleurs, l'originalité de la description clinique par rapport aux peu de cas déjà décrits tient dans le fait que l'anémie s'est présentée sur un versant très hémolytique dès la naissance avec de très faibles signaux dysérythropoïétiques au myélogramme. Les mutations du gène *VPS4A* apparaissent *de novo* et il semble y avoir un « hot spot » mutationnel dans ce gène. Le syndrome CIMDAG (cerebellar hypoplasia, cataracts, impaired intellectual development, congenital microcephaly, dystonia, dyserythropoietic anemia, and growth retardation) est un syndrome de découverte et de description récentes (Seu et al., 2020) qui peut se présenter sous une forme hématologique prédominante.

4.2 Résultats des études ARN

4.2.1 Tableau de résultats

Nous ne détaillerons pas dans cette partie le phénotype des patients ayant été explorés. Ces résultats visent à illustrer l'intérêt des études de transcrits pour aider à la classification de variations. Des variations d'intérêt ayant un effet potentiel sur l'épissage ont été mises en évidence chez ces patients sur l'ADN génomique. Une étude de transcrits a été demandée lors du rendu de résultat. Nous avons pu obtenir des prélèvements sur tubes Paxgene pour explorer 23 patients dont 3 trios familiaux (cas index/père/mère) (Tableau 2). Une fois l'ARN messager extrait du tube Paxgene, une étape de reverse transcription a été réalisée puis une amplification PCR ciblée et un séquençage Sanger. Une quantification par RT-Q-PCR a également été mise en œuvre.

ID patient	Gène	Mutation génomique	Statut	Résultats séquence cDNA	Résultats RT-Q-PCR	Reclassification
BQE2858 ARN	<i>ANK1</i> <i>NM_020476.2</i>	c.4462C>T (p.R1488*)	Hétérozygote	Mutation non vue sur cDNA, pas de saut d'exon	Diminution de 65% de production des transcrits <i>ANK1</i>	Probablement pathogène à pathogène
BQE2100 ARN	<i>SPTB</i> <i>NM_001024858.2</i>	c.5623C>T (p.Gln1875*)	Hétérozygote	Mutation non vue sur cDNA, pas de saut d'exon	Diminution de 33% de la quantité de transcrits <i>SPTB</i>	Probablement pathogène à pathogène
BQE2232 ARN	<i>SPTB</i> <i>NM_001024858.2</i>	c.6706C>A (p.L2236M) ; c.6737C>T (p.A2246V) en cis	Hétérozygote	Présence des deux variations sur cDNA (25%)	Diminution de 70% de production des transcrits <i>SPTB</i> avec gène de ménage <i>HBB</i> et <i>MPP1</i>	VSI à pathogène
BQE2316 ARN	<i>SPTB</i> <i>NM_001024858.2</i>	c.647G>A (p.R216Q)	Hétérozygote	Saut de l'exon 5 en phase = délétion en phase de 27 AA	NF	VSI à probablement pathogène
BGL21031 ARN	<i>SPTA1</i> <i>NM_003126.2</i>	c.1688G>A (p.R563Q)	Hétérozygote	RAS, on retrouve bien la mutation sur cDNA	Diminution de 52% de production des transcrits <i>SPTA1</i>	Demeure un VSI, complexe car <i>SPTA1</i>
BQE2342 ARN	<i>ANK1</i> <i>NM_001142446</i>	c.1801-2A>C	Hétérozygote	Présence d'une délétion de 57 paires de bases à l'état hétérozygote dans l'exon 16 du gène <i>ANK1</i> .	Diminution de 46% de la production des transcrits <i>ANK1</i>	Probablement pathogène à pathogène
BQE2306 ARN	<i>SPTA1</i> <i>NM_003126.2</i>	c.4442+1G>A	Hétérozygote	Présence d'une délétion complète à l'état hétérozygote de l'exon 31 du gène <i>SPTA1</i>	NF	Probablement pathogène à pathogène
BQE2377 ARN	<i>ANK1</i> <i>NM_020476.2</i>	c.2098-1G>T	Hétérozygote	RAS	Diminution de 37% de la production des transcrits <i>ANK1</i>	Probablement pathogène à pathogène
BQE2545 ARN	<i>SLC4A1</i> <i>NM_000342</i>	c.1961G>T (p.G654V)	Hétérozygote	RAS	Production de transcrits <i>SLC4A1</i> en quantité normale	Demeure VSI étude protéique nécessaire
BQE2598-ARN	<i>SPTA1</i> <i>NM_003126.2</i>	c.6843-2A>G	Hétérozygote	Délétion en phase de l'exon 50 à l'état hétérozygote	Quantité normale de transcrits <i>SPTA1</i>	Probablement pathogène à pathogène

ID patient	Gène	Mutation génomique	Statut	Résultats séquence cDNA	Résultats RT-Q-PCR	Reclassification
BGL22266-ARN cas index	HK1 NM_033496	c.34C>T (p.Arg12*)	Homozygote	Présence de la mutation homozygote sur cDNA	Quantité de transcrits spécifiques GR et ubiquitaires normale	Probablement pathogène à VSI Etude protéique nécessaire
BGL22265-ARN père	HK1 NM_033496	c.34C>T (p.Arg12*)	Hétérozygote	Présence de la mutation hétérozygote sur cDNA	Quantité de transcrits spécifiques GR et ubiquitaires normale	
BGL22280-ARN mère	HK1 NM_033496	c.34C>T (p.Arg12*)	Hétérozygote	Présence de la mutation hétérozygote sur cDNA	Quantité de transcrits spécifiques GR et ubiquitaires normale	
BQE2803 ARN	ANK1 NM_020476.2	c.1900-17G>A	Hétérozygote	Création d'un site AG alternatif en -17 et rétention dans l'intron 16 à partir de -15 rajout de 5AA	Pas de diminution des transcrits ANK1	Pathogène, déjà connue (Edelman et al., 2007)
BGL20080 ARN cas index	SEC23B NM_001172745.1	c.1710dupT (p.Arg571*) d'origine maternelle et recherche d'un second événement mutationnel sur les transcrits d'origine paternelle	Hétérozygote	Absence de la mutation R571* sur le cDNA	Une diminution de 73% de l'expression des transcrits SEC23B	Probablement pathogène à pathogène
BGL20078 ARN père	SEC23B NM_001172745.1				Diminution de 35% de l'expression des transcrits SEC23B	
BGL20079 ARN mère	SEC23B NM_001172745.1				Diminution de 38% de l'expression des transcrits SEC23B	
BQE2763 ARN	EPB42 NM_000119.2	c.1408+4C>T c.744+7G>A	Hétérozygote	Pas de saut d'exons ni de modification de séquence	En cours de mise au point	Demeurent VSI pour le moment
BQE2936 ARN	ANK1 NM_001142446	c.1405-9G>A	Hétérozygote	Création d'un site cryptique accepteur d'épissage dans la séquence de l'intron 13, 7 pb en amont du site canonique accepteur d'épissage de l'intron 13	Diminution globale de 64% des transcrits ANK1, les deux mutations sont en cis (mère non porteuse)	VSI à pathogène
BQE2936 ARN	ANK1 NM_001142446	c.3946C>T (p.Q1316*)	Hétérozygote	Absence de la mutation sur le cDNA	Diminution globale de 64% des transcrits ANK1, les deux mutations sont en cas (mère non porteuse)	Probablement pathogène à pathogène
BQE2250 ARN	SLC4A1 NM_000342	c.1458C>G (p.Y486*)	Hétérozygote	Absence de la mutation sur le cDNA	Diminution de 50% des transcrits SLC4A1	Probablement pathogène à pathogène
BQE2265 ARN	SLC4A1 NM_000342	c.486-2A>G	Hétérozygote	Absence de mutations ou de saut d'exon	Diminution de 50% des transcrits SLC4A1	Probablement pathogène à pathogène
BQE2237 ARN	ANK1 NM_001142446	c.5620C>T (p.R1874*)	Hétérozygote	Absence de la mutation sur le cDNA	Diminution de 60% de la quantité de transcrits ANK1	Probablement pathogène à pathogène

Tableau 2 : Résultats étude de transcrits

RAS = pas d'effet, NF = non fait, cDNA = ADN complémentaire

Le fait de retrouver une variation non-sens dans la séquence du cDNA n'est pas en faveur de mRNA decay, le fait de ne pas la retrouver sur le cDNA est en faveur d'une destruction de l'allèle portant cette variation par mRNA decay (Kurosaki and Maquat, 2016). Le processus de mRNA decay permet en effet à la machinerie cellulaire de dégrader les transcrits portant des codons STOP prématuré (avant le dernier exon du gène) par un système complexe de surveillance. L'échappement d'un codon STOP à ce processus est possible et entraîne la probable production d'une protéine tronquée. La destruction de l'allèle portant le codon stop prématuré conduit à une diminution de la quantité de transcrite du gène concerné. Ces études de transcrits nous ont permis de reclasser onze variants de la classe probablement pathogène à pathogène, trois variants de VSI à pathogène, un variant de VSI à probablement pathogène, un variant de probablement pathogène à VSI (*HK1*), quatre variants demeurent des VSI et une variation déjà décrite comme pathogène où nous confirmons l'effet délétère. Concernant la variation non-sens identifiée à l'état homozygote dans le gène *HK1* codant pour l'hexokinase et déjà référencée dans la littérature comme causale d'un déficit en hexokinase (Jamwal et al., 2019), les résultats de l'étude ARN nous ont permis de mettre en évidence la persistance de cette variation non-sens sur les transcrits du cas index à l'état homozygote et des parents à l'état hétérozygote. Ceci n'est pas en faveur d'une destruction des transcrits par mRNA decay et va donc à l'encontre d'un effet délétère de cette variation sur la transcription. Une étude protéique est nécessaire dans ce cas. La mesure d'activité hexokinase standardisée (données non publiées et non fournis dans cette thèse) chez le cas index a toujours montré des valeurs normales et ce sur les différentes fractions de densité des GR.

Les résultats concernant les transcrits *SPTA1* sont complexes à interpréter car souvent non reproductibles avec l'agent intercalant utilisé. Le gène *SPTA1* est en effet exprimé en quantité 7 fois supérieure à ce qui serait nécessaire ("Synthesis and assembly of membrane skeletal proteins in mammalian red cell precursors," 1987) ce qui rend plus complexe sa quantification et l'interprétation de celle-ci. Nous sommes en train de mettre en place pour *SPTA1* une technique de quantification basée sur des sondes et non un agent intercalant (Chonat et al., 2019).

4.3 Etudes familiales

4.3.1 Famille *GATA1*

4.3.1.1 Description du cas

Le cas index est un patient de 32 ans avec une anémie hémolytique sévère inexplicquée d'apparition récente. Le SHD a montré la présence d'une variation de signification incertaine du gène *GATA1* (c.1066G>A; p.G356S) à l'état hémizygotique (ChrX) et ce à la fois sur l'ADN extrait depuis les cellules sanguines et également depuis les bulbes capillaires confirmant le caractère constitutionnel de cette variation. Des études fonctionnelles collaboratives menées par l'équipe du Dr Zahra Kadri au CEA ont été lancées dans un premier temps car la famille n'était pas

disponible pour l'étude génétique familiale. Mais la famille a pu finalement se rendre disponible rendant réalisable l'étude génétique ciblée par séquençage Sanger sur le gène *GATA1*.

4.3.1.2 Résultat génétique

L'arbre généalogique associé aux résultats de l'étude génétique ciblée a pu montrer que tous les frères du patient étaient également porteurs hémizygotés du même VSI de *GATA1* excluant ainsi le rôle délétère à lui seul de ce variant. Les frères bien portants du patient qui ont le même génotype ne présentent pas du tout le même phénotype (Figure 42).

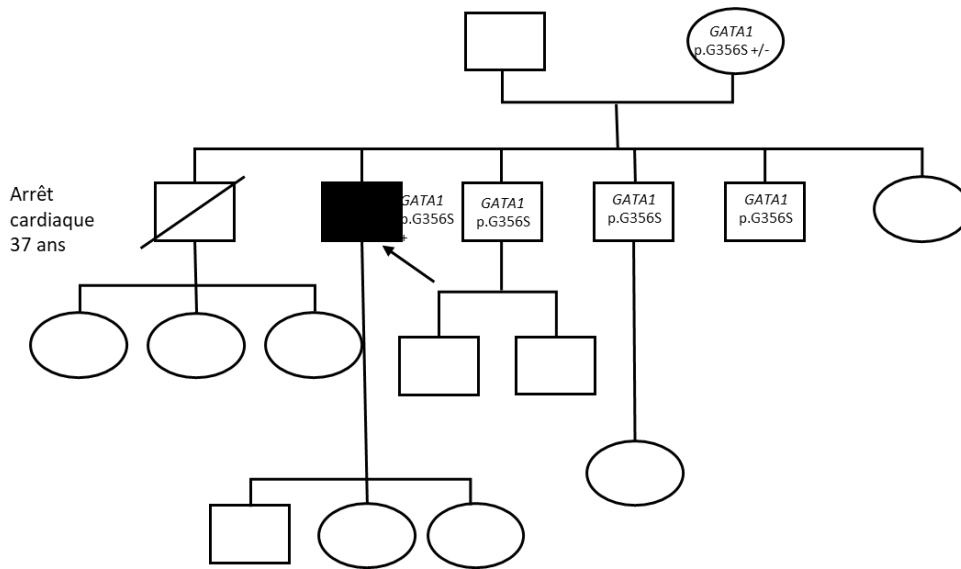


Figure 42 : Arbre généalogique famille *GATA1*

4.4 Description clinico-biologique et génétique des patients d'intérêt

Il s'agit de patients inclus en SHD et ayant pu bénéficier d'une approche complète de type : densité des GR, LORRCA et étude électrophysiologique à Roscoff. La numérotation proposée pour ces patients est valable dans l'ensemble dans ce document, exceptés les articles où une numérotation des patients est propre à chaque publication.

Patient 1 et 1'

	Nomenclature nucléotidique	Nomenclature Protéique	Exon	Statut	gnomAD AF %	Littérature	Prediction <i>in silico</i>	Classe ACMG
Patient 1								
Anémie hémolytique congénitale avec une surcharge en fer +++ identifiée comme GARDOS, fibrillation auriculaire, histoire familiale AD, 1 fils avec même profil phénotypique sans la fibrillation auriculaire porteur <i>KCNN4</i> R352H +/-								
<i>KCNN4</i>	c.1055G>A	p.R352H	exon 7	hétérozygote	ND	Rapetti-Mauss <i>et al</i> 2015	délétère	5
<i>PIEZO1</i>	c.3629C>T	p.A1210V	exon 25	hétérozygote	0,007% (13 htz/92310)	ND	bénin	3

Tableau 3 : Description du patient 1

Le patient 1 présente un syndrome de Gardos qui est une forme de stomatocytose héréditaire déshydratée due à une mutation délétère du gène *KCNN4* p.R352H. Le SHD réalisé a mis en évidence la présence d'un VSI à l'état hétérozygote du gène *PIEZO1* chez ce patient en plus de la mutation pathogène connue du gène *KCNN4* (Tableau 3). Son fils : Patient 1' est également atteint d'un syndrome de Gardos et ne porte que la mutation connue du gène *KCNN4* p.R352H à l'état hétérozygote.

Patient 2

	Nomenclature nucléotidique	Nomenclature Protéique	Exon	Statut	gnomAD AF %	Littérature	Prediction <i>in silico</i>	Classe ACMG
Patient 2								
Patiente SS gravissime, maladie hémolytique très sévère avec une expression faible de de l'hémoglobine foetale et une expression 30% de cellules denses. Transfusée 7 à 10 fois dont certains épisodes sont reliés au paludisme. Une seule fois elle a présenté une intolérance à la transfusion avec apparition d'oedème de la face Drépanocytose SS, Hb de base à 5 g/dl, profil hyperhémolytique. Pas de déficit en g6pd. Pas de carence vitaminique ni martial. TDA vérifié négatif. Traitée par Hydroxyurée + EPO. Syndrome de Li Fraumeni muté <i>TP53</i> associé								
<i>PIEZO1</i>	c.5089C>T	p.L1697F	exon 37	hétérozygote	ND	ND	délétère	3
<i>PIEZO1</i>	c.1031C>T	p.Ala344Val	Exon 9	hétérozygote	0,0034%	ND	bénin	2
<i>SPTA1</i>	c.3064A>T	p.Asp1021Val	Exon 22	hétérozygote	0,040%	ND	Non conclusifs	3
<i>HBB</i>	c.20A>T	p.Glu6Val		homozygote		connue HbS		5

Tableau 4 : Description du patient 2

Il s'agit d'une patiente avec un syndrome drépanocytaire majeur de type S/S avec un syndrome de Li Fraumeni associé et 30% de cellules denses (Tableau 4). Les résultats du SHD ont montré en plus de la mutation HbS, un VSI du gène *PIEZO1* et un VSI du gène *SPTA1* à l'état hétérozygote.

Patient 3

	Nomenclature nucléotidique	Nomenclature Protéique	Exon	Statut	gnomAD AF %	Littérature	Prediction <i>in silico</i>	Classe ACMG
Patient 3								
Beta thalassémie majeure avec thromboses+++ splénectomisé en 1981, thrombose portale en 2006, sous EPO (arrêté) et hydroxyurée, transfusé toutes les 4 semaines, sous Xarelto depuis 2017, inclus dans essai clinique sous luspatercept en 2018 (antagoniste TGF beta) depuis et arrêté en 2018, depuis thromboses à répétition malgré l'anticoagulation								
<i>PIEZO1</i>	c.6056G>A	p.R2019H	exon 42	hétérozygote	0,0013% (2 htz/77522)	ND	délétère	3
<i>SPTB</i>	c.2759C>T	p.P920L	exon 14	hétérozygote	ND	ND	délétère	3
<i>SPTA1</i>	c.6531-12C>T			hétérozygote		Ittiwut <i>et al</i> 2018		
<i>HBB</i>	c.92+6T>C		Intron 1	hétérozygote		connue		5
<i>HBB</i>	c.315+1G>A		Intron 2	hétérozygote		connue		5

Tableau 5 : Description du patient 3

Il s'agit d'un patient présentant une Beta thalassémie majeure avec des thromboses à répétition depuis sa splénectomie en 1981 (

Tableau 5). On note un antécédent de thrombose portale en 2006, sous EPO (arrêté) et Hydrea. Il est en échange transfusionnel toutes les 4 semaines et sous Xarelto depuis 2017. Il a été inclus dans essai clinique sous luspatercept en 2018 (antagoniste TGF beta) et arrêté en 2018 suite à une majoration des événements thrombotiques. Un SHD explorant les gènes de pathologies de membrane du GR et les dysérythropoïèses congénitales a été réalisé. Plusieurs variations d'intérêt ont été mises en évidence en plus des mutations causales de la beta-thalassémie du gène *HBB*. Il présente deux VSI dans les gènes *PIEZO1* et *SPTB*.

Patient 4

	Nomenclature nucléotidique	Nomenclature Protéique	Exon	Statut	gnomAD AF %	Littérature	Prediction <i>in silico</i>	Classe ACMG
Patient 4	Hémolyse compensée régénérative avec une surcharge en fer +++ découverte lors d'un bilan pour fatigue. Maladie de Gilbert déjà connue							
<i>PIEZO1</i>	c.4071C>G	p.I1357M	exon 29	hétérozygote	ND	ND	pathogène	3

Tableau 6 : Description du patient 4

Le patient 4 présente une hémolyse compensée associée à une maladie Gilbert et une surcharge en fer nécessitant des saignées, de type stomatocytose héréditaire déshydratée. Le SHD a mis en évidence un VSI hétérozygote non connu du gène *PIEZO1* (Tableau 6).

Patient 5

<i>hétérozygote</i>	Nomenclature nucléotidique	Nomenclature Protéique	Exon	Statut	gnomAD AF %	Littérature	Prediction <i>in silico</i>	Classe ACMG
Patient 5	Anémie néonatale avec splénomégalie et surcharge en fer							
<i>KCNN4</i>	c.965C>T	p.A322V	Exon 6	hétérozygote	ND	Article 4	pathogène	3

Tableau 7 : Description du patient 5

Le patient 5 est décrit dans l'article 4 de ce travail en page 128. Il s'agit d'un patient présentant un syndrome de GARDOS avec une nouvelle mutation du gène *KCNN4*. Il présente des thromboses multiples en post-splénectomie (Tableau 7). Il est décédé récemment d'une hémorragie cérébrale.

Le Tableau 8 en page 114 comporte les données biologiques des patients 1, 1', 2, 3, 4 et 5

	Patient 1	Patient 1'	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Valeurs normales
Splénectomie	oui	oui	non	oui	non	oui	
P50 mmHg	28,8	29,2	NF	28,6	24,4	31,2	24-28
Carboxyhb %	3,1	3,8	NF	2	2,4	3,3	<1,5
Ohyper	390	379	336	390	353	381	
Omin	137	118	116	116	108	62	
Eimax	0,534	0,524	0,356	0,546	0,617	0,523	
Aire	141,6	140,3	82,4	147,1	138,5	139,3	
Lorrca	oui	oui	oui	oui	oui	oui	
Na⁺ mM	142	141	140	139	139		136-145
K⁺ mM	4	3,9	3,7	4,1	4,1		3,4-5
Cl⁻ mM	104	102	107	103	103		98-107
HCO₃⁻ mM	25,5	27,4	22,2	22,9	26,2		22-29
Protéines g/L	74	75	78	80	66		64-83
Urée mM	4,5	3,9	1,8	7,1	4,5	7	<8,3
Créatinine μM	81	66	40	70	75	71	<80 (F) <106 (H)
DFG CKD epi	91	128	164	108	114	105	
DFG MDRD	85	128	136	106	103	102	
Ca²⁺ mM	2,39	2,35	2,64	2,42	2,32		2,15-2,55
P mM	1,04	1,11	0,8	1,19	1,02		0,80-1,45
Acide urique μM	464	316	441	510	266		140-340
PAL U/l	66	107	106	96	68	48	35-105
ALAT U/l	27	37	24	73	30	20	<35
ASAT U/l	31	28	43	70	27	36	<35
Bilirubine totale μM	69	161	49,6	22,2	92	76	<21
Bilirubine conjuguée μM	11	18	12,3	8,3	8	12	<3,4
GGT U/l	24	11	43	112	16	31	<40
LDH U/l	278	203	567		150	449	<250
Hb plasmatique mg/L	88	84,5	NF	160	67	90	
Orosomucoide g/L	0,6	0,5	1,3	1	0,4	0,7	0,5-1,2
Haptoglobine g/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,7	<0,1	0,3-2,0
CRP mg/L				2,7	0,3		<5

Fer sérique µM	27,3	43,6	24	49,1	36	39,7	5,8-34,5 (F) 11,5-31 (H)
Ferritine µg/l	273	1369	233	535	705	254	15-150 (F) 30-400 (H)
Transferrine g/L	2,2	1,9	2,1	1,8	1,8	1,9	2,0-3,6 (F) 23,8 (H)
Récepteur soluble transferrine mg/l	13,7	9,7	NF	18,4	6,4	11,6	1,9-4,4 (F) 2,2-5 (H)
CTF µM	56	46	45	44	46	48	50-80 (F) 50-110 (H)
CS %	49	94	45	111	79	82	20-40
Leucocytes G/l	14,9	23,3	13,2	16,3	7,68	10,1	4-10
Hématies T/l	3,2	2,4	1,5	3,1	4,31	2,4	4,2-5,4 (F) 4,6-6,2 (H)
Hb g/dL	plasma ictérique	9,6	nf	8,3	13,8	8,6	12-16 (F) 13-17 (H)
Hématocrite %	33	27	14	26	40	25	36-48 (F) 39-51 (H)
VGM fl	102	112	98	83	92,4	107	80-100
TCMH pg	plasma ictérique	40	nf	27	32,1	37	>27
CCMH g/dl	plasma ictérique	36	nf	32	34,7	34	32-36
IDR	15	16	23	18	14,6	16	<15
Plaquettes G/l	446	662	477	527	236	319	150-400
VMP fl	8,4	8,5	8,6	10,4	9,4		7,5-11,2
Réticulocytes G/L	736	353	212	122	417	391	20-120
PNN G/L	6,3	7,5	7,5	9,3	NF	4,3	1,5-7
PNE G/L	0,6	0,3	0,2	0,2	NF	0,6	0-0,8
PNB G/L	0,3	0,2	0,1	0,2	NF	0,2	0-0,2
Lymphocytes G/L	5,6	12,9	4,3	5,1	NF	3,9	1-4
Monocytes G/L	2,2	4	1,1	1,6	NF	1,1	0,2-1
Frottis	anisopoikilocytose, macrocytose, cellules cibles, quelques corps de Jolly, acanthocytes, hématies ponctuées	anisopoikilocytose, macrocytose, cellules cibles, quelques corps de Jolly, sphérocytes,	anisopoikilocytose, polychromasie, corps de jolly, drépanocytes	anisopoikilocytose, polychromasie, hématies cibles, corps de jolly, hématies ponctuées, plaquettes géantes, hématies vrillées	Quelques cellules cibles et stomatocytes	anisopoikilocytose, polychromasie, macrocytose, hématies cibles, corps de jolly rares, quelques acanthocytes, anomalies de répartition de l'Hb, rares micromégacaryocytes	
G6PD UI/ Hb	21,2	18,9	21	19,2	13,7	27,3	11-17
PK U/g Hb	27,7	30,9	84,7	43,8	20,4	31	14-19
GPI U/g Hb	41,2	44,3		63,2	48	51,4	33-54

TPI U/g Hb	1317	1534					1080-1600
HK U/g Hb	2,2	2,4	4,5	3,7	1,8	3,2	0,74-1,14
P5N U/g Hb	10,9	8,4		6,3	21,3	15,4	5,6-9
HbA2 %	2	2,1	3,8	2,8	3,4	2,5	2,1-3,1
HbF %	0,5	2,4	3,3	8,3	0,2	2	<1
HbA %	89,7	86,4	0	70	89,9	87,2	90-100
HbA1c %	4	3,9	NF	NF	NF		
HbS %	absente	absente	87,9	absente	absente		
D50 g/ml	1,1	1,095	1,098	1,093	1,098	1,095	<1,110
% cellules denses	19	9	30	2	33	9	<2%
EMA	normal	normal		NF	normal	NF	<16%

Tableau 8 : Résultats biologiques des patients 1, 1', 2, 3, 4 et 5 ; H = Hommes ; F = Femmes

4.5 Etude de la densité des GR en gradient de phtalates

Les courbes représentent la proportion en pourcent d'érythrocytes dont la densité est supérieure à celle testée. Les tracés de courbes en vert représentent la répartition de densité des globules rouges de sujets sains. Le pourcentage de cellules denses correspond à l'ordonnée correspondant au point d'abscisses de densité = 1,110. Le pourcentage de cellules denses d'un sujet normal est nul (rendu <1%). En annexe 6 (Annexe 6 - Profils courbe de densité des GR selon les pathologies) se trouvent les profils de courbe de densité des GR selon les pathologies. Cette technique permet à la fois de déterminer le pourcentage de cellules denses érythrocytaires et aussi d'obtenir un profil de répartition de la densité des GR selon un gradient connu d'esters de phtalates.

4.5.1 Etude de stabilité

Des études de stabilité de la mesure de la densité des GR en gradient de phtalates ont été effectuées à la fois selon la durée de stockage et la température de stockage.

Nous notons un effet du stockage sur les résultats obtenus notamment pour les sphérocytoses héréditaires (Figure 43). Différentes conditions ont été testées : J0 = le jour du prélèvement sans stockage et étude réalisée dans les 2 heures suivant le prélèvement, J1 +4°C = stockage 24h à +4°C, J2 +4°C = stockage 48h à +4°C, J1 TA = stockage 24h à température ambiante, J2 TA = stockage 48h à température ambiante. L'ensemble de ces conditions n'a pas pu être réalisé pour tous les patients testés.

Pour les patients SH avec des mutations *ANK1* et *SLC4A1* il y a un recalage vers la gauche (vers la répartition normale) de la courbe de densité avec le temps, probablement dû à la disparition des cellules « denses like » (sphérocytes probables) plus fragiles ou à une réhydratation des cellules anormales. Pour le seul patient avec une mutation *SPTB* testé il ne semble pas y avoir d'effet du stockage à +4°C pendant 24h sur le profil de la courbe de densité qui demeure anormal.

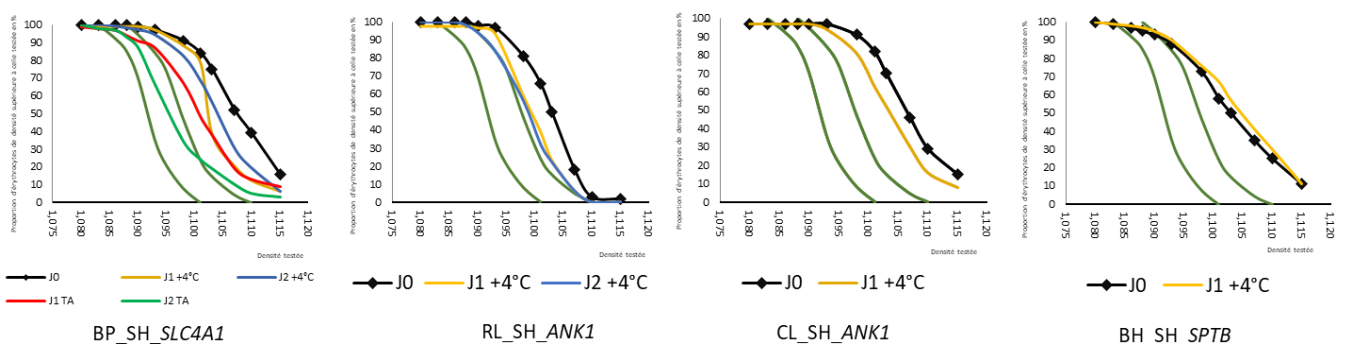


Figure 43 : Profils de stabilité des courbes de densité des GR des patients avec SH

BP, RL, CL et BH représentent les initiales des patients SH testés

Nous avons pu tester deux patients avec des dysérythropoïèses congénitales de type 1 et 2. Il n'y a pas d'effet du stockage à +4°C pour le patient avec une CDA1 mais un effet important pour celui-ci avec une CDA2 qui s'associe de manière connue à un défaut de la membrane (Figure 44).

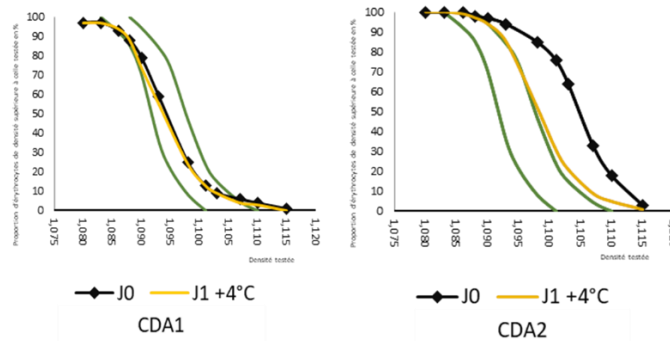


Figure 44 : Profils de stabilité des courbes de densité des GR de patients avec CDA = dysérythropoïèse congénitale

Nous avons pu tester la stabilité en fonction des conditions de stockage de la courbe de densité des GR de deux patients avec un syndrome de GARDOS : Patients 1 et 1' et d'un patient avec une stomatocytose héréditaire déshydratée mutée *PIEZO1* : Patient 4. On observe un recalage vers la gauche (réhydratation ou disparition des cellules déshydratées) en fonction du temps beaucoup plus marqué à température ambiante (Figure 45).

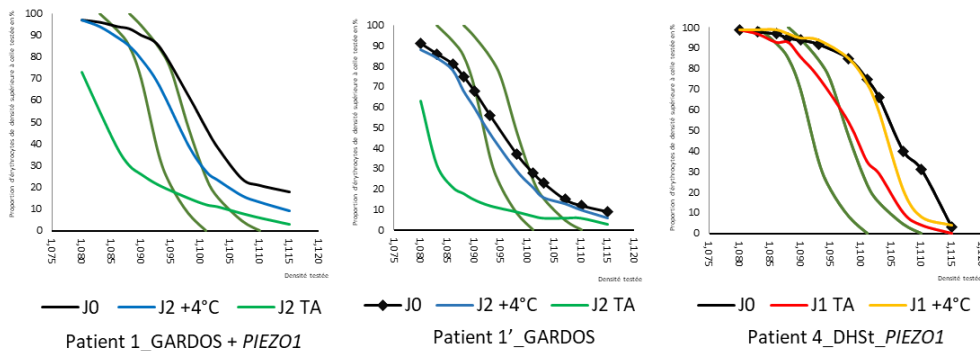


Figure 45 : Profils de stabilité des courbes de densité des GR dans le cas des stomatocytoses héréditaires déshydratées

La stabilité a pu être évaluée en mesurant le taux de cellules denses ou denses-like en suivant ce taux comme marqueur de stabilité (Tableau 9 et Figure 46).

	% Denses J0	% Denses J1 +4°C	% Denses J1 TA	% Denses J2 +4°C	% Denses J2 TA
Patient 1_GARDOS+PIEZO1	21			13	6
Patient 1'_GARDOS	12			10	6
Patient 4_DHSt_PIEZO1	31	8	4		
CDA1	4	3			
CDA2	18	5			
BP_SLC4A1	39	12	13	19	5
RL_ANK1	3	0			
CL_ANK1	29	16			
HB_SPTB	25	30			

Tableau 9 : Pourcentage de cellules denses à J0, J1+4°C, J1 TA, J2+4°C, J2 TA chez différents patients avec des pathologies de membrane du GR et CDA (valeurs normales <1%)

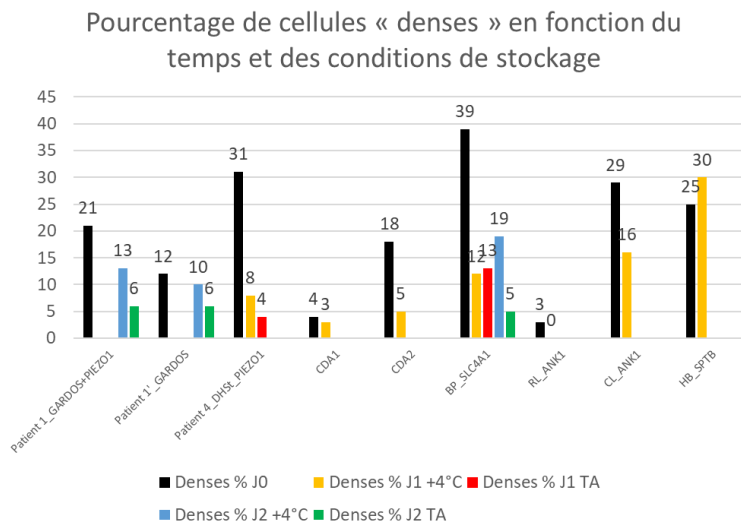


Figure 46 : Pourcentage de cellules denses en fonction du temps et de la température de stockage chez des patients avec pathologies de membrane du GR et CDA

On observe une diminution du taux de cellules denses avec le temps, à J1 et ce même à +4°C dans la CDA2, chez le patient 4_DHSt_PIEZO1, la SH SLC4A1 (BP_SLC4A1), la SH ANK1 (RL et CL_ANK1). Concernant les patients avec syndrome de Gardos, on observe pour le patient 1 une diminution de 39% du taux de cellules denses à J2 +4°C par rapport à J0 alors que chez le patient 1' uniquement muté KCNN4 on observe une diminution uniquement de 20% entre J0 et J2+4°C. Concernant le patient SH avec mutation SPTB (HB_SPTB) nous observons une légère augmentation des cellules denses après 24h à +4°C mais cette expérience n'a été réalisée qu'une fois. Pour le patient CDA1 le stockage 24h à +4°C ne semble pas avoir d'effet.

4.5.2 Profils selon pathologies

L'intérêt de la mesure des cellules denses et de la mesure de la densité de GR en gradient de phtalates a été démontré dans le suivi des patients avec des syndromes drépanocytaires majeurs. Il n'y a pas d'autres applications diagnostiques connues aujourd'hui. Les courbes de densité en gradient de phtalates de dix-huit patients avec une sphérocytose héréditaire (SH) confirmée par diagnostic génétique, d'un patient avec une CDA1, d'un avec une CDA2, d'un avec un SHUa, de quatre elliptocytoses, de cinq stomatocytoses héréditaires déshydratées ou associations *PIEZO1*, de trois GARDOS (Annexe 6 - Profils courbe de densité des GR selon les pathologies) ont été réalisées.

Pour les cas de SH étudiés, on observe dans tous les cas un décalage vers la droite (globules rouges les plus denses = cellules « denses-like » déshydratées) des courbes des patients par rapport à une répartition normale. En effet il ne s'agit pas de cellules denses au sens initial du terme utilisé pour caractériser les cellules anormales des patients drépanocytaires mais de cellules dont la densité est modifiée du fait d'un défaut des protéines de membrane du GR ou de désordres hydroélectrolytiques.

Pour les autres pathologies, nous disposons de peu de cas pour affirmer une tendance mais les stomatocytoses déshydratées mutées *PIEZO1* montrent des profils décalés sur la droite. Les trois patients testés avec un syndrome de Gardos montrent un profil de courbe atypique qui semble assez spécifique mais nous disposons de trop peu de cas pour confirmer cette tendance.

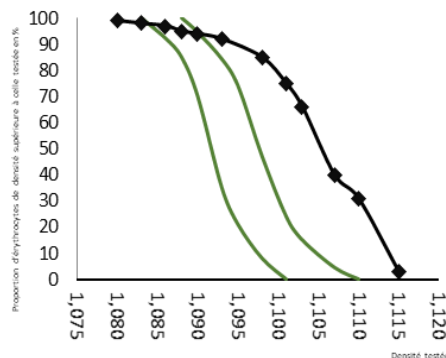


Figure 47 : Courbe de densité en gradient de phtalates du patient 4_DHSt_PIEZO1

Le profil montre un décalage vers la droite et 33% de cellules denses

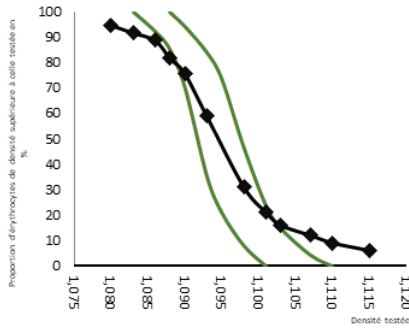


Figure 48 : Courbe de densité en gradient de phtalates du patient 5 avec un syndrome de Gardos

On observe 9% de cellules denses

4.5.2.1 Interprétation des courbes de densité du GR pour les cas des associations de variants

4.5.2.1.1 Patient 1

Le Patient 1 est porteur d'une mutation délétère connue du gène *KCNN4* (p. R352H), (Rapetti-Mauss et al., 2015) et d'un VSI du gène *PIEZO1* à l'état hétérozygote. Son fils le patient 1', est porteur uniquement de la mutation pathogène du gène *KCNN4*.

Les courbes de densité en gradient de phtalates réalisées à J0 ont pu être réalisées chez le père et le fils sur 3 années différentes et montrent une différence significative du taux de cellules denses entre le père et le fils. Le taux de cellules denses correspond au point d'ordonnées en pourcent correspondant à la densité 1,110 en abscisses. Les cellules du père semblent donc plus déshydratées.

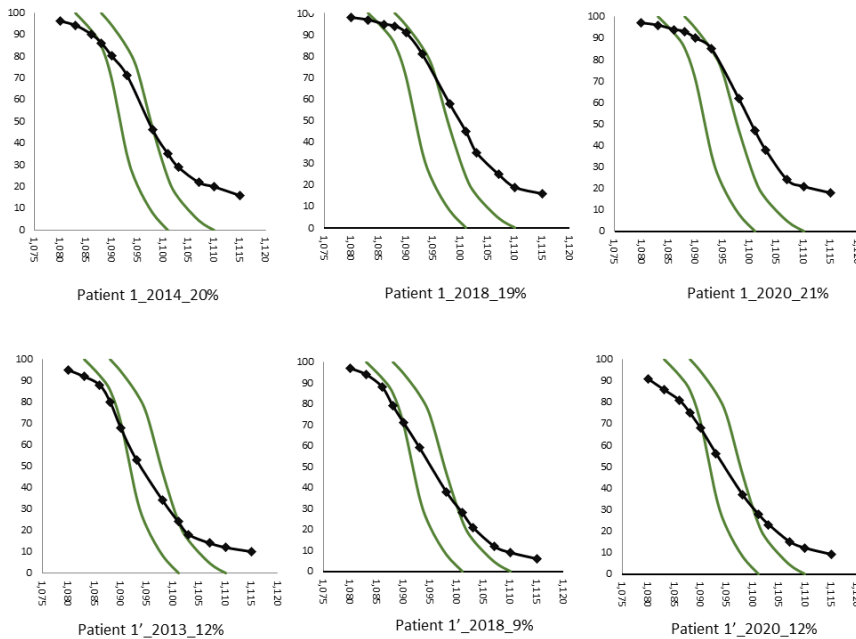


Figure 49 : Courbes de densité à J0 pour le patient 1 et 1' réalisées à trois temps différents

On note une différence significative (t-Test) du taux moyen de cellules denses en % entre le père et le fils.

4.5.2.1.2 Patient 2

Nous avons une courbe de densité des GR de 2018 avant transfusion pour cette patiente qui montre un taux de cellules denses très élevé : 30% dans un contexte hyperhémolytique (Figure 50 et Figure 51).

Sur 448 patients Bartolucci et collaborateurs en 2012 (Bartolucci et al., 2012b) ont montré que la moyenne de cellules denses chez des patients SS était de 13+/-7% avant hydroxyurée et transfusions. Cette patiente présente donc un taux de cellules denses atypique pour un sujet SS ayant poussé à réaliser une recherche de variants associés par SHD.

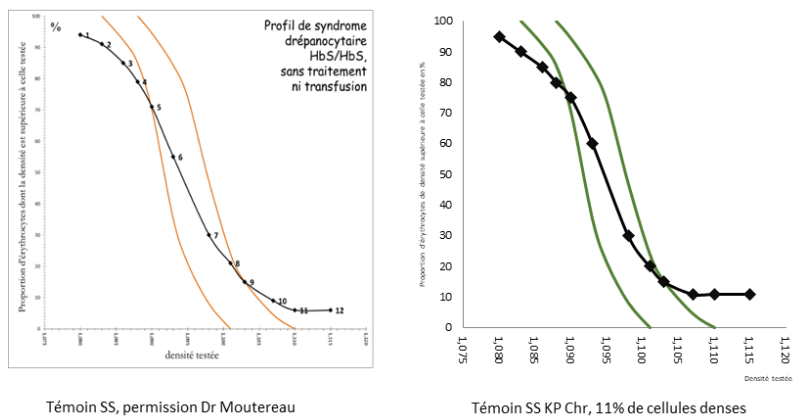


Figure 50 : Courbes de densité des GR pour des patients SS avec taux de cellules denses standard

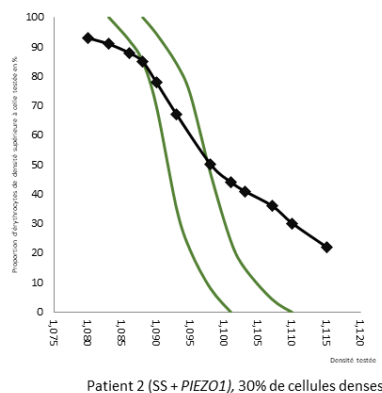


Figure 51 : Courbe de densité des GR à distance d'une transfusion du Patient 2, patiente SS avec VSI *PIEZO1*

La patiente 2 présente un taux très élevé de cellules denses possiblement en relation avec le VSI du gène *PIEZO1* qu'elle porte à l'état hétérozygote en plus de sa drépanocytose.

4.5.2.1.3 Patient 3

Le profil de densité des GR en gradient de phtalates réalisé pour le patient 3 avant transfusion mais à 4 semaines de la dernière transfusion montre un profil superposable à celui d'autres patients avec des syndromes beta thalassémiques majeurs en programme transfusionnel régulier (Figure 52).

Il y a un très faible contingent de cellules « denses like » : 2% non vu chez les autres patients. Ces résultats sont tributaires de la distance par rapport aux transfusions qui peuvent fausser ces résultats.

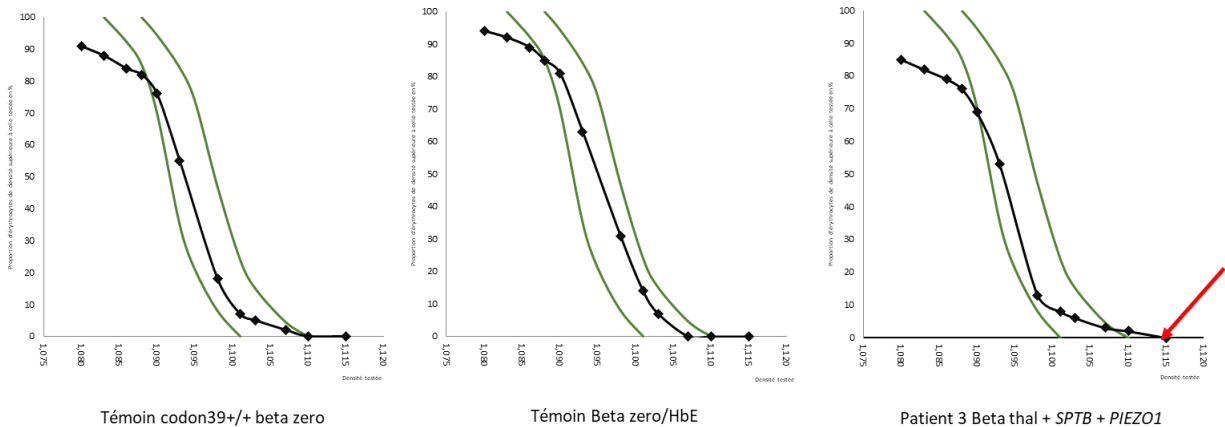


Figure 52 : Profils de patients avec beta thalassémies majeures/intermédiaires et le patient 3

4.6 Résultats LORRCA osmoscan

Les courbes d'osmoscan représentées dans cette partie représentent l'index d'élongation (EI en ordonnées) en fonction de l'osmolalité en mOsm/kg en abscisses. Les courbes en gris représentent les profils de 17 sujets sains réalisés en moins de 24h après le prélèvement avec ou sans stockage à +4°C quand réalisées dans les heures suivants le prélèvement. L'osmoscan permet d'étudier la déformabilité des GR en fonction de la concentration osmotique. Il s'agit d'une étude des propriétés de la membrane. Les paramètres Omin, Ohyper, Aire sous la courbe et Elmax permettent de définir l'état d'hydratation, la résistance osmotique et la capacité de déformabilité du GR.

4.6.1 Point d'intérêt majeur : importance du préanalytique

4.6.1.1 Test de stabilité

4.6.1.1.1 Patients GARDOS

Avec le temps et selon le mode de conservation on observe une « réhydratation » des cellules avec un décalage vers la droite du profil initial avec une augmentation de l'aire sous la courbe et une augmentation de Ohyper dans toutes les conditions (

Tableau 10 et

Tableau 11).

Pour les patients Gardos testés, les profils sont différents à J1 de ceux à J0 et ce quelle que soit la condition de conservation (Figure 53 et Figure 54).

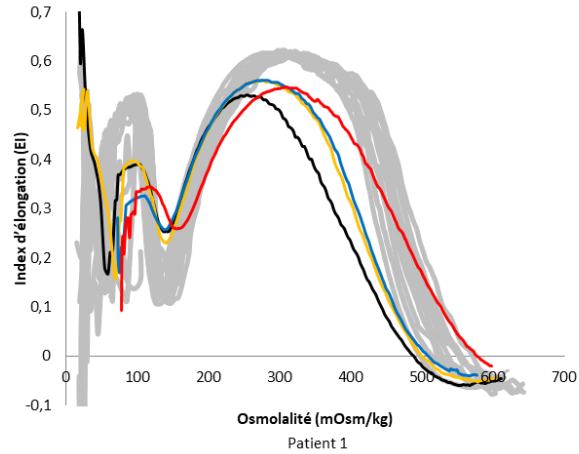


Figure 53 : Profils osmoscan en LORRCA du patient 1

J0 en noir, J1 +4°C en jaune, J1 TA en rouge et J2 +4°C en bleu, TA = température ambiante. En gris les profils de témoins normaux.

Paramètre osmoscan Patient 1	J0	J1+4°C	J2+4°C	J1 TA	J2 TA
Omin	142	141	138	159	NF
Eimax	0,532	0,561	0,562	0,547	NF
Ohyper	388	408	415	464	NF
Aire	140,3	152,9	153,6	155,8	NF

Tableau 10 : Paramètres osmoscan Patient 1 à J0, J1 +4°C, J2 +4°C et J1 TA

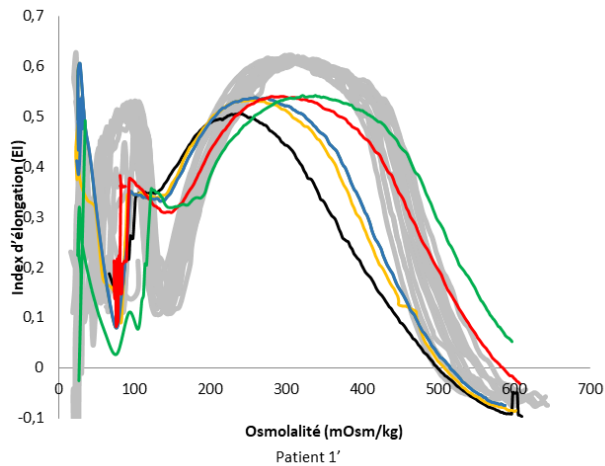


Figure 54 : Profils osmoscan en LORRCA du patient 1'

J0 en noir, J1 +4°C en jaune, J1 TA en rouge, J2 +4°C en bleu et J2 TA en vert, TA = température ambiante. En gris les profils de témoins normaux

Paramètre osmoscan Patient 1'	J0	J1 +4°C	J2 +4°C	J1 TA	J2 TA
Omin (127,5-151,5)	238	121	126	142	157
Eimax (0,606-0,634)	0,507	0,533	0,538	0,54	0,542
Ohyper (416,33-488,33)	379	405	413	473	508
Aire (166,79-182,79)	133,9	149,3	152,9	163	156,8

Tableau 11 : Paramètres osmoscan du patient 1' à J0, J1 +4°C, J2 +4°C, J1 TA et J2 TA

4.6.1.1.2 Patient 4 DHSt PIEZO1

On note une augmentation de la valeur Omin avec le temps à +4°C et à TA signant une normalisation de la résistance osmotique, une augmentation du paramètre Ohyper signant une diminution de la CCMH et donc une réhydratation des cellules avec le temps, plus marquée à J2 et à TA et une augmentation de l'aire sous la courbe avec le temps plus importante à TA. On ne note pas de modification du paramètre Eimax, l'index de déformabilité reste inchangé (Figure 55 et

Tableau 12).

Pour les DHSt *PIEZO1* une conservation à +4°C est impérative et une réalisation en maximum 24h après le prélèvement semble possible sans altérer de manière significative les principaux paramètres de l'osmoscan.

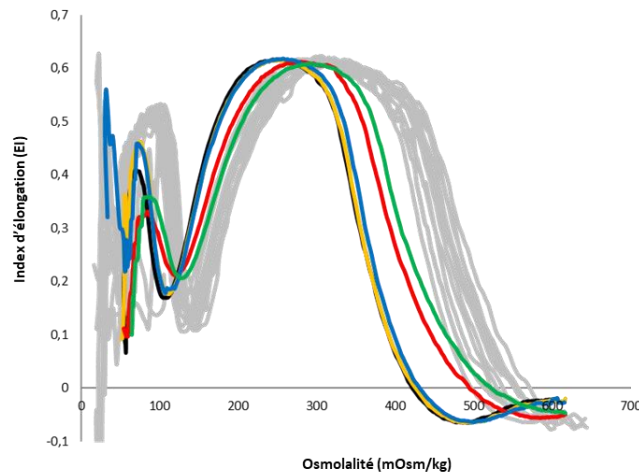


Figure 55 : Profils osmoscan en LORRCA du patient 4_DHSt_PIEZO1

En noir à J0, en jaune à J1 +4°C, en bleu à J2 +4°C, en rouge à J1 TA et en vert à J2 TA. En gris les profils de témoins normaux

Patient 4_DHST_PIEZO1	J0	J1 +4°C	J2 +4°C	J1 TA	J2 TA
Omin (127,5-151,5)	108	113	121	108	128
Eimax (0,606-0,634)	0,617	0,616	0,612	0,618	0,609
Ohyper (416,33-488,33)	353	355	393	361	405
Aire (166,79-182,79)	138,5	140,2	157,7	143,7	161,7

Tableau 12 : Paramètres osmoscan pour le patient 4 à J0, J1 +4°C, J2 +4°C, J1 TA et J2 TA

4.6.2 Cas des pathologies simplex

Les profils d'osmoscan sont bien différenciés par cette technique avec des profils type bien connus et déjà publiés pour les pathologies de membrane du globule rouge (Da Costa et al., 2016b; Zaninoni et al., 2018b).

Nous avons testé 38 patients en osmoscan : 11 SH typiques, 4 elliptocytoses héréditaires, 1 CDA2, 1 CDA1, 2 DHSt *PIEZO1*, 3 GARDOS, 16 autres, (SHUa muté CFH, A/S symptomatiques, S/S gravissimes, beta thalassémie) (Annexe 7 - Profils LORRCA différents patients selon pathologie, et Figure 55 pour l'osmoscan du patient 4 et l'article 4 pour l'osmoscan du patient 5).

4.6.2.1 Exemple de la mutation p.R352H de *KCNN4*

La variation p.R352H du gène *KCNN4* est une mutation délétère connue et décrite fonctionnellement qui est impliquée dans le syndrome de Gardos. Elle est décrite par plusieurs équipes (Andolfo et al., 2015; Fermo et al., 2017; Zaninoni et al., 2018b) comme générant des profils en ektacytométrie ou LORRCA superposables aux profils des témoins normaux. Cependant nous avons pu réaliser des profils en osmoscan de deux patients 1 et 1' présentant un syndrome de Gardos dû à cette mutation connue du gène *KCNN4* p.R352H. Les profils obtenus à deux temps différents à un an d'intervalle sont strictement identiques pour chaque patient et totalement pathologiques en comparaison à des témoins normaux. On observe une diminution de l'index de déformabilité maximum, une augmentation de la résistance osmotique avec diminution de Omin pour le patient 1', une diminution de Ohyper marqueur de déshydratation chez le patient 1 et 1'. Il faut noter que le père porte en plus un VSI du gène *PIEZO1*.

Ces profils en osmoscan ont été réalisés le jour du prélèvement (dans les 2h suivant le prélèvement) sans stockage.

Les profils que nous avons obtenus pour nos patients sont donc clairement pathologiques contrairement à ceux publiés (Tableau 13, Figure 56 et Tableau 14).

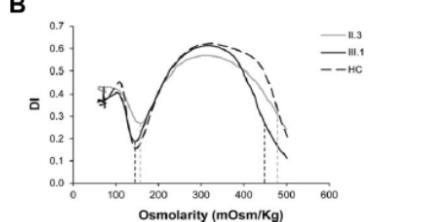
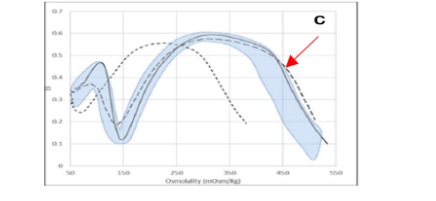
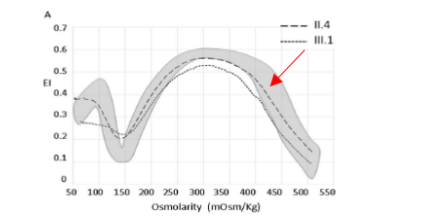
<p>Andolfo et al 2015, AJH</p> <p><i>KCNN4</i> c.1055G>A (p.R352H)</p> <p>GARDOS</p>		<p>B</p> 	<p>Ektacytomètre classique</p> <p>Patient II-3 est splénectomisé profil après splénectomie</p> <p>Ici pas d'effet visible sur la résistance osmotique</p> <p>Ces profils ressemblent à nos profils obtenus après 2 jours à TA pour le patient II-3</p>
<p>Zaninoni et al 2018, Frontiers in Physiology</p> <p><i>KCNN4</i> c.1055G>A (p.R352H)</p> <p>GARDOS</p>		<p>C</p> 	<p>LORRCA</p> <p><i>“On the contrary, the remaining three patients, presenting R352H mutation in KCNN4 gene, displayed Osmoscan parameters comparable to normal controls”</i></p> <p>Pointillés fins = 6 patients DHSt PIEZO1</p>
<p>Fermo et al 2017, Scientific reports</p> <p><i>KCNN4</i> c.1055G>A (p.R352H)</p> <p>GARDOS</p>		<p>A</p> 	<p>LORRCA</p> <p>Patients II-4 et III-1 (mère et fille)</p> <p>II-4 splénectomisée pas III-1</p> <p>Après 24h à 4°C</p> <p>Ils disent qu'après 24h à 37°C tous les profils osmoscan sont altérés même les contrôles</p>

Tableau 13 : Données de la littérature concernant les profils en ektacytométrie ou LORRCA en osmoscan de patients avec la mutation p.R352H de *KCNN4*

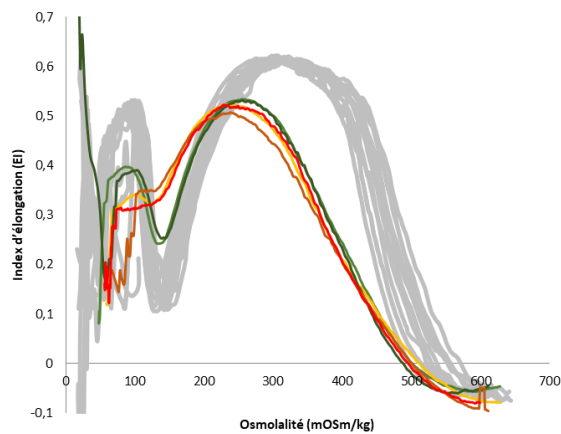


Figure 56 : Profils Osmoscan en LORRCA des patient 1 et patient 1' en 2018 et 2020

En vert clair : patient 1 JO 2018, vert foncé patient 1 JO 2020, jaune patient 1' JO 2018, marron patient 1' JO 2020, en rouge le patient 5 autre patient GARDOS avec une mutation différente p.A322V, en gris les profils de témoins normaux

Il existe une contradiction entre les données publiées et nos données analytiques probablement liée aux conditions pré-analytiques des autres études réalisées.

4.6.3 Cas des associations de variants : profils osmoscan

4.6.3.1 Patient 1 et 1'

Les profils d'osmoscan des patients 1 et 1' sont décrits en Figure 56. Les paramètres de l'osmoscan sont rapportés dans le Tableau 14.

	Mutation	Omin 2018/2020	Aire 2018/2020	Eimax 2018/2020	Ohyper 2018/2020
Patient 1	<i>KCNN4</i> R352H +/- et <i>PIEZO1</i> A1210V+/-N	137/142	141,6/140	0,534/0,532	390/388
Patient 1'	<i>KCNN4</i> R352H+/-	118/120 (J1)	140,3/133,9	0,524/0,507	379/379
Patient 5 Témoin positif	<i>KCNN4</i> A322V+/-	62	139,3	0,523	381
Normes (17 sujet sains)		127,5 ; 151,5	166,79 ; 182,79	0,606 ; 0,634	416,33 ; 488,33
Interprétation		Omin diminué chez le patient 1' et 5 mais normal chez le patient 1		Eimax diminué = diminution de la surface et de la déformabilité	Diminution Ohyper identique = déshydratation

Tableau 14 : Paramètres osmoscan des patient 1 et patient 1' réalisés en 2018 et 2020 et chez le patient 5

Le patient 5 présente un syndrome de GARDOS avec une autre mutation réalisé en 2020. En vert les valeurs dans les normales, en bleu les valeurs diminuées par rapport à la normale

On observe une diminution de la déformabilité maximale chez les patients GARDOS étudiés par rapport à un pool de témoins (EI max diminué), une diminution de Ohyper signant la déshydratation *in vitro*. Le paramètre Omin est un reflet de la résistance osmotique = osmolarité minimale supportée par les GR, ce paramètre est diminué chez le patient 1' et le témoin positif patient 5. Chez le père, le patient 1 porteur de la mutation *KCNN4* p.R352H et du VSI *PIEZO1* on observe un paramètre Omin normal reflet d'une résistance osmotique normale. Les profils osmoscan des patients 1 et 1' ont été réalisés à deux reprises deux années différentes et sont parfaitement superposables d'une année à l'autre.

Cette différence observée sur le paramètre Omin est probablement due à la différence génotypique retrouvée en SHD entre le patient 1 et 1'.

4.6.3.2 Patient 2

L'Eimax et l'aire sous la courbe du patient 2 sont diminués par rapport au pool de patients SS testé (Figure 57 et

Tableau 15).

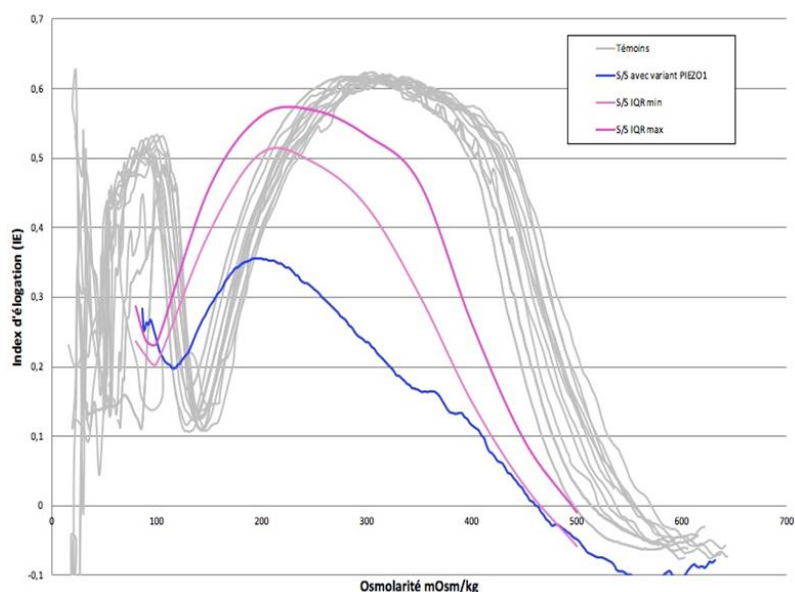


Figure 57 : Profils osmoscan en LORRCA du patient 2

en bleu le patient 2, en rose interquartile minimum et maximum de 19 patients SS sans hydroxyurée, en gris profils de témoins normaux

	Patient 2	Valeurs normales sur 19 SS avec des taux de cellules denses <20%
Omin	116	68-119 (moyenne +/-2sd)
EImax	0,356	0,4254-0,6715
Ohyper	336	236-491
Aire	82,4	96-185

Tableau 15 : Paramètres osmoscan du patient 2 et valeurs normales des paramètres osmoscan obtenus chez 19 patients SS sans hydroxyurée

4.6.3.3 Patient 3

Ce profil est assez similaire à celui de patients avec des syndromes thalassémiques majeurs déjà publiés (Schrier et al., 1989) (Figure 58).

Il n'y a pas de différence visible par rapport à d'autres patients avec des beta thalassémies majeures/intermédiaires publiés sur les paramètres mesurés :

Omin = 116 ; Eimax = 0,546 ; Ohyper = 390 ; Aire = 147,1

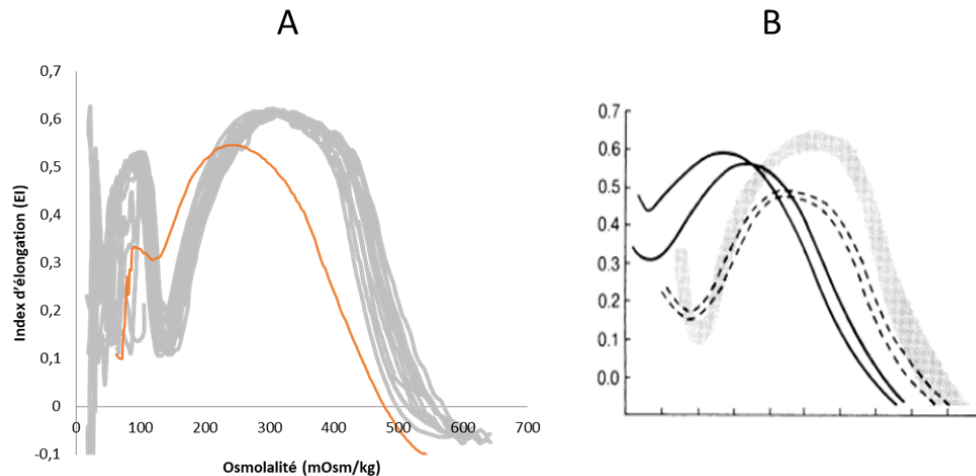


Figure 58 : Profil osmoscan en LORRCA du patient 3 avant transfusion

A- Profil du patient 3 en orange et en gris témoins normaux. B- Profil de patients beta thalassémique splénectomisés en trait plein noir et patients beta-thalassémiques non splénectomisés en pointillés noirs issu de (Schrier et al., 1989)

4.6.4 Résultats étude fonctionnelle d'électrophysiologie réalisée à Roscoff

Les études électrophysiologiques réalisées à Roscoff permettent de mesurer directement sur les GR du patient le potentiel de la membrane par simplification de l'équation de Nernst et en présence du composé CCCP permettant d'extrapoler les variations du pH extracellulaire aux variations de potentiel de membrane. Pour les cas présentés les composés suivants ont été utilisés :

- NS309 permet d'augmenter l'affinité du canal GARDOS au calcium, le canal pouvant alors s'activer aux concentrations intracellulaires normales de calcium
- A23187 crée des pores à la membrane et permet l'entrée maximale de calcium, il permet d'activer le canal Gardos à son maximum. Cette expérience est réalisée sur un temps plus long car après l'hyperpolarisation, peut survenir une « repolarisation » induite par l'activation des canaux cationiques non sélectifs (dont PIEZO1). Ceux-ci sont généralement plus actifs dans les cas du vieillissement des cellules et souvent chez les patients avec DHSt.
- YODA1 est un agoniste connu du canal PIEZO1 utilisé pour tester l'effet de mutations notamment simplex de *PIEZO1*. YODA1 augmente la probabilité d'ouverture de PIEZO1 mais ralentit aussi sa période réfractaire d'inactivation. En cas de mutation gain de fonction de *PIEZO1* l'utilisation de YODA1 chez un patient montre une hyperpolarisation plus importante de la membrane des GR et un retour à l'état basal beaucoup plus lent que chez un témoin normal

4.6.4.1 Cas dits simplex

4.6.4.1.1 Patient 4 DHSt PIEZO1

La mesure du contenu en eau réalisée pour le patient 4 en Figure 59 montre une déshydratation.

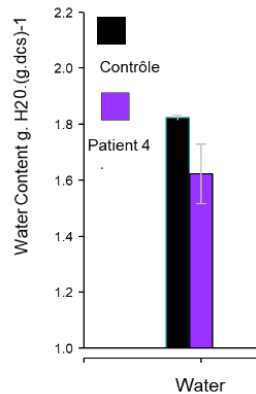


Figure 59 : Contenu en eau mesuré pour le patient 4

En condition A23187 pour le patient 4 on note une hyperpolarisation plus importante que celle du contrôle et une pente de repolarisation plus importante signe d'une suractivation des cationiques non sélectifs dont fait partie PIEZO1 chez le patient 4 par rapport au contrôle (Figure 60).

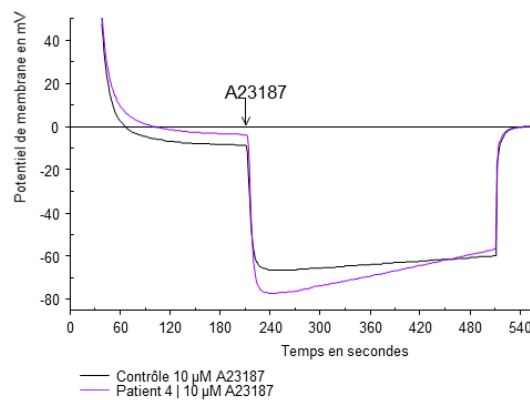


Figure 60 : Résultat d'étude électrophysiologique avec A23187 pour le patient 4 DHSt *PIEZO1*

L'expérience menée en NS309 montre une activité Gardos similaire sur les deux échantillons testés (Figure 61). Un tel résultat indique que la concentration initiale de calcium dans les cellules est probablement identique entre les deux échantillons et en dessous du seuil d'activation du canal GARDOS.

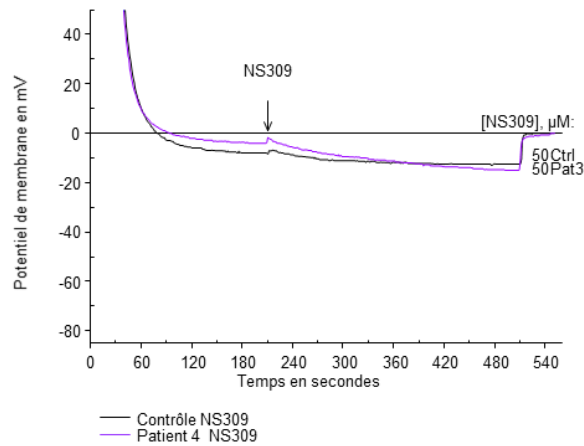


Figure 61 : Résultat d'étude électrophysiologique avec NS309 pour le patient 4 DHST *PIEZO1*

L'expérience réalisée en présence de YODA1 (Figure 62) permet de voir que la perméabilité calcique est plus importante chez le patient en comparaison du contrôle. En effet YODA1 est un activateur pharmacologique de Piezo1 qui mime l'effet mécanosensible. On voit clairement que l'hyperpolarisation qui suit l'ajout de YODA1 est bien plus prononcée montrant que plus de calcium est entré dans la cellule. Ceci implique une hyperpolarisation plus longue jusqu'à ce que la pompe PMCA ait rétabli les concentrations intracellulaires en calcium.

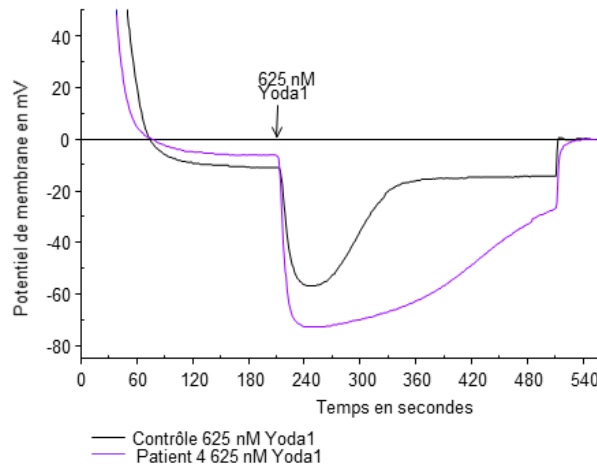


Figure 62 : Résultat d'étude électrophysiologique avec YODA1 pour le patient 4 DHST *PIEZO1*

4.6.4.1.2 Patient 5 : Article 4

4.6.4.1.2.1 Présentation

Cette lettre à l'éditeur de l'American journal of Hematology présente les résultats d'une étude fonctionnelle réalisée chez un patient (patient 5 dans cette thèse) présentant une anémie hémolytique de type syndrome de Gardos identifiée par SHD avec la présence d'une variation de signification incertaine dans le gène *KCNN4* p.Ala322Val à l'état hétérozygote (Mansour-Hendili et al., 2021). Il s'agit d'une variation non connue et non récurrente du syndrome de Gardos. Seules quelques familles atteintes de syndrome de Gardos sont décrites aujourd'hui (une vingtaine). Par ailleurs, ce patient a la particularité de souffrir de thromboses multiples depuis l'âge de 20 ans sans cause annexe identifiée. La prise d'anagrelide a permis la disparition des thromboses. Le profil en osmoscan des GR de ce patient montre une courbe anormale décalée sur la gauche avec une diminution des paramètres Omin, Ohyper et Eimax comme chez un autre patient Gardos avec la mutation connue pathogène p.R352H. L'effet de la mutation p.A322V du canal Gardos sur les flux d'électrolytes à travers la membrane du GR a pu être testée par l'équipe du Dr Egée au CNRS de Roscoff. Il utilise une technique basée sur l'utilisation d'un protonophore le CCCP qui crée des pores dans la membrane du GR permettant le passage des ions H⁺. En milieu non tamponné la mesure du pH extracellulaire est un reflet de la variation de potentiel de membrane du GR par simplification de l'équation de Nernst. Une comparaison à un témoin normal et à un autre patient Gardos muté p.R352H a permis de confirmer le caractère délétère de cette variation en montrant une hyperpolarisation de la membrane des GR du patient suite à l'addition de NS309 due à la suractivité du canal Gardos conduisant à une sortie massive de K⁺.

CORRESPONDENCE



Multiple thrombosis in a patient with Gardos channelopathy and a new *KCNN4* mutation

To the Editor:

Dehydrated hereditary stomatocytosis (DHS) is an autosomal dominant hemolytic disease characterized by red blood cell dehydration due to increased membrane permeability to cations. This default in permeability leads to cell volume dysregulation and morphologic abnormalities. Note, DHS is characterized by heterogeneous phenotypic presentation, varying from hydrops foetalis to mild anemia or asymptomatic well-compensated hemolysis.¹ Two subtypes have been molecularly defined, DHS1 due to *PIEZO1* gain-of-function mutations (representing 90% of all cases) and DHS2 (also named Gardos channelopathy) due to *KCNN4* gain-of-function mutations. Gardos channelopathy is a very rare subtype with less than a dozen families reported so far. So, *KCNN4* encodes the Potassium Calcium-Activated Channel Subfamily N Member 4 in which gain of function mutations result in increased sensitivity to calcium influx, leading to KCl loss and cell dehydration.¹⁻⁴ Previous reports highlighted differences between the two forms of DHS. Although iron overload can be observed in both entities, perinatal edema and post-splenectomy thrombosis have mostly been reported in DHS1 so far, while severe anemia appears to be a frequent manifestation of DHS2. Only a few *KCNN4* mutations have been identified to date: V282M, V282E, S314P, R352H and V369_Lys373del, whereas more than 40 different mutations have been reported in *PIEZO1*. Here, we report on a patient with Gardos channelopathy syndrome, which harbored a novel *KCNN4* mutation and suffered from several episodes of venous and arterial thrombosis after splenectomy.

The proband is a 49-year-old man referred to our center for undiagnosed hemolytic anemia. He had no family history of anemia or hemolysis. Hemolysis was first diagnosed at 1 month of age, in a context of infectious disease. The patient had a severe anemia (Hb = 3.7 g/dl) requiring transfusion. He then suffered from several hemolytic crises during childhood, generally related to infectious episodes. An abdominal painful crisis at age 10 led to a splenectomy. After splenectomy, hemoglobin stabilized between 8 and 9 g/dl; hemolysis persisted with undetectable haptoglobin levels and high levels of plasma hemoglobin and free heme, and platelet count increased to 700 000–800 000/ μ l. At age 30, he was investigated for hyperferritinemia (3193 μ g/L). Liver biopsy showed iron overload and portal and periportal fibrosis. The *HFE* gene sequencing was negative.

Phlebotomy was then initiated. During the same year, he underwent cholecystectomy for gallstones, which was complicated by catheter-related thrombosis in the left arm. Fludione (vitamin K antagonist used in Europe, same family as warfarin) was introduced for a period of 3 months. Shortly after the withdrawal of fludione, he developed facial hemiparesis, revealing an ischemic stroke due to middle cerebral artery thrombosis. Extensive thrombosis investigations showed normal results (absence of FII G20210A and FV Leiden mutations; normal levels of antithrombin III, homocysteinemia, proteins S and C; absence of anticardiolipin antibodies) and there was no family history of thrombosis. Fludione was reintroduced. Two months later, he was hospitalized for erysipelas complicated by left peroneal vein thrombosis. The INR at admission was 1.92. Despite treatment with Low Molecular Weight Heparin and increased doses of fludione, thrombosis extended to the left femoral vein. Within 3 days, platelet count increased from 700 000/ μ l to 2 000 000/ μ l. Hydroxyurea was introduced but rapidly replaced by anagrelide because it was ineffective. Bone marrow study, performed while the patient was under hydroxyurea treatment, showed a rich marrow with marked signs of dyserythropoiesis, as already described in Gardos patients³: there were numerous binucleated erythroblasts, very rare intercytoplasmic bridges and internuclear bridges, but no evidence of dysgranulopoiesis or dysmegacaryopoiesis. Under anagrelide treatment, platelet count decreased to 800 000/ μ l. Since then, under a combined treatment with fludione and anagrelide and despite the fact that he had several episodes of erysipelas during the last 19 years, he had no subsequent thrombotic event. Platelet count remained between 300 000 and 650 000/ μ l except during two episodes of acute inflammation due to knee trauma and erysipelas (platelet count >1 000 000/ μ l). At age 47, studies for myeloproliferative neoplasm were again negative (absence of *CALR*, *MPL* or *JAK2* mutations). At 48, whole-body MRI showed ectopic thoracic (juxta-vertebral T9/T10) hematopoiesis. Red blood cell membrane phenotype investigation with ektacytometry at age 31 showed a profile suggestive of "atypical hereditary dehydrated stomatocytosis" (raw data not available). At age 48, blood smear evaluation showed macrocytosis, poikilocytosis with acanthocytes, target cells, abnormal hemoglobin repartition in RBC, rare spherocytes, rare Howell-Jolly bodies and basophilic stippling (Figure 1(A) control, Figure 1(B) patient's blood smear). Cell blood count and biochemical tests showed regenerative macrocytic anemia with high total and conjugated bilirubin, high LDH, undetectable haptoglobin, high plasma hemoglobin and high free heme, suggestive of a high level of hemolysis (Figure 1(C)). LORRCA

ABBREVIATIONS: DHS, dehydrated stomatocytosis; ET, essential thrombocythemia; Lcw, liter cell water; NGS, next generation sequencing; RBC, red blood cell; VKA, vitamin K antagonist; VUS, variant of uncertain significance.

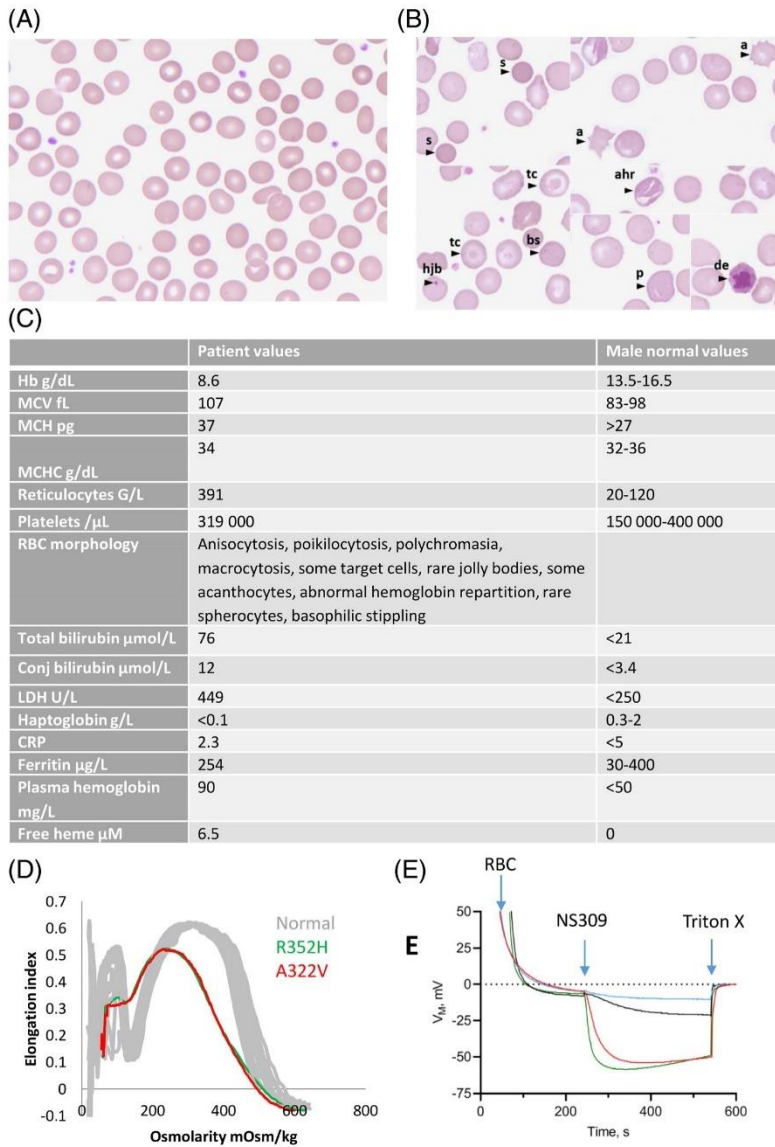


FIGURE 1 Morphological description, biological results and functional characterization of *KCNN4* A322V RBCs. (A) Blood smears were prepared from control and (B) patient using May-Grünwald Giemsa staining (Biolyon). Several aberrant shapes were noticed: a = acanthocyte; ahr = abnormal hemoglobin repartition; tc = target cells; hjb = Howell-Jolly body; de = dystrophic erythroblast; p = polychromatophilia; bs = basophilic stippling; s = spherocyte. (C) Biological tests results. (D) LORRCA profile analysis: Osmoscan profile of the A322V patient (red) showing dehydration, Maximum Elongation Index (Elmax) decrease and osmotic resistance increase when compared to a pool of normal individuals (in gray). A very similar profile was obtained in a Gardos patient harboring the R352H mutation (green). (E) Monitoring of change in membrane potential using CCCP method. RBCs from controls (blue and black) and patients (A322V, red; R352H, green) were injected in a Ringer's solution (1 mM Ca²⁺) containing CCCP at a concentration of 20 μ M. Gardos channel was activated using NS309 (100 μ M). The experiment was terminated by the addition of Triton X to the medium

(Mechanotronics) profile with osmoscan analysis (performed within 24 h after sampling and following manufacturer recommendations) showed dehydration, increased osmotic resistance and decreased red blood cells (RBC) deformability (Figure 1(D)) similar to those of *KCNN4* R352H patients investigated in our lab. Next generation sequencing (NGS) on blood DNA was performed as previously described.⁵ Genetic analysis revealed a variant of uncertain significance (VUS) in the *KCNN4* gene (NM_002250): c.965C > T (p.Ala322Val), absent from all genomic databases (including >125 000 subjects from the

gnomAD database). The predicted amino acid change is located within the calmodulin binding site of the Gardos channel. Polyphen-2 and Mutation taster prediction tools (but not ALIGN GVGD or Sift) were suggestive of a deleterious effect. We did not find any other pathogenic or probably pathogenic variation in other genes involved in congenital hemolytic anemia.

Functional studies were performed on fresh RBC from patients and controls. Water cell content was determined by calculating the weight difference between wet cells and dried cells. Ionic content

was measured using a flame photometer (PFP7, Jenway). The amounts of Na⁺ or K⁺ measured were reported as mmol/Liter cell water (mmol/Lcw). Cell morphology analysis was performed on blood smears prepared from patient and control blood shipped within 24 h at 4°C, fixed with methanol and stained with freshly prepared Giemsa (10%, 15 min) (Sigma-Aldrich). Pictures were taken at ×100 magnification and morphology analyses were performed using ImageJ software to determine cell circularity and roundness (n = 1301 cells for A322V patient and 1371 for control).⁶ Circularity was obtained with the formula: $\text{Circularity} = 4\pi \frac{\text{Area}}{(\text{perimeter})^2}$ and roundness was obtained with the formula: $\text{Roundness} = 4 \times \frac{\text{Area}}{\pi \times (\text{Major axis})^2}$. Results showed that despite a cell water content (1.76) and a cell content of Na⁺ (33 mmol/Lcw) and K⁺ (106 mmol/Lcw) close to normal values, the patient's RBC had a significantly larger projected surface area than wild type red blood cells (52.4 ± 10.1 μm² vs 35.4 ± 5.3 μm², p < 0.001, unpaired t test). The circularity of the A322V cells was significantly altered (0.81 ± 0.09 vs WT 0.84 ± 0.08, p < 0.001, unpaired t test), confirming the poikilocytosis observed on blood smear. Because of the localization of the mutation within the calmodulin binding domain, the susceptibility of Gardos channel activity to calcium was tested by measuring membrane potential changes in the presence of CCCP (carbonylcyanide-m-chloro-phenyl-hydrazone)⁴ on fresh blood sampled on heparin and shipped at 4°C within 24 h. Channel activity was assessed using NS309 (100 μM, Alomone), a compound which lowers the threshold for Gardos channel activation by calcium, and thus allows to test calcium sensitivity of Gardos channel at nominal intracellular calcium concentration. In WT RBC, NS309 at a concentration of 100 μM only induced a slight hyperpolarization whereas in A322V and in R352H cells it resulted in a marked hyperpolarization (Figure 1(E)). The same experiments were also performed at a lower concentration of NS309 (50 μM) and showed similar results (data not shown). These results clearly indicate that, similarly to other mutations identified in the calmodulin binding domain, the A322V mutation results in a hypersensitivity of the Gardos channel to Ca²⁺ and likely allows more frequent transient activations of the channel, which may lead to cell dehydration.

This patient harbors a novel KCNN4 variation (p.A322V) identified by NGS and classified as pathogenic thanks to functional studies. To date, only a limited number of Gardos patients have been reported, and no thrombotic events have yet been reported in splenectomized patients.¹ This is quite surprising, since KCNN4 mutations result in intravascular hemolysis, which is not improved by splenectomy. The persistence of high levels of hemolysis after splenectomy is a known risk factor for thrombotic event.^{7,8} Several PIEZO1-mutated patients developed thrombosis after splenectomy. Our observation shows that Gardos channelopathy also can be complicated by episodes of venous and arterial thrombosis. The exact role of thrombocytosis in the occurrence of thrombosis in our patient remains unclear, but it has to be noticed that platelet count increased at 10 years of age, just after splenectomy, whereas the first thrombotic event occurred 20 years later. We

cannot completely exclude that the patient could have essential thrombocythemia (ET) in addition to Gardos channelopathy (bone marrow biopsy was not performed to definitively exclude ET), but this seems highly unlikely: platelet count increased at 10 years of age, 39 years ago, and all relevant tests performed to date (bone marrow study, NGS myeloid results) did not support a diagnosis of myeloproliferative neoplasm. Thrombocytosis investigation did not find any evidence for another cause for thrombosis in this patient. In the literature, platelet count is not correlated to the risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia or with post-splenectomy thrombocytosis.^{7,8} Conversely, the involvement of the Gardos channel in platelet activation is supported by experimental data.^{9,10} In our patient, the beneficial effect of anagrelide may be mediated by its intrinsic platelet-inhibiting properties and by the modulation of intracellular calcium concentrations,¹¹ resulting in a decreased activity of the mutated Gardos channel. More observations are needed to accurately assess the risk of thrombotic events in KCNN4-related channelopathies. However, precautions (including careful follow-up with extensive platelet and coagulation testing) already seem necessary in case of splenectomy in Gardos patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mrs Emmanuelle Faubert and Mrs Christine Gameiro for the realization of NGS and Mr Guillaume Gricourt for bioinformatic analysis.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Lamisse Mansour-Hendili^{1,2}, Stéphane Egée^{3,4},
David Monedero-Alonso^{3,4}, Guillaume Bouyer^{3,4},
Bertrand Godeau^{5,6}, Bouchra Badaoui⁷, Ariane Lunati^{1,6},
Clara Noizat¹, Abdelrazak Aissat^{1,6}, Laurent Kiger², Chadia Mekki¹,
Véronique Picard⁸, Stéphane Moutereau^{1,2}, Pascale Fanen^{1,6},
Pablo Bartolucci^{2,9}, Loïc Garçon^{10,11,12}, Frédéric Galactéros^{2,9},
Benoît Funalot^{1,6}

¹Département de Biochimie-Biologie Moléculaire, Pharmacologie, Génétique Médicale, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, Créteil, Val-de-Marne, France

²IMRB Equipe Pirene, Laboratoire d'excellence LABEX GRex, Université Paris Est Créteil, 61 Avenue du Général de Gaulle, Créteil, Val-de-Marne, 94000, France

³CNRS, Integrative Biology of Marine Models, Sorbonne Université, Place Georges Teissier, Roscoff, Finistère, 29680, France

⁴Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Laboratoire d'Excellence GR-Ex, 24, Boulevard du Montparnasse, Paris, Ile-de-France, 75015, France

⁵Département de médecine interne, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, Créteil, Val-de-Marne, 94010, France

⁶INSERM, IMRB, Université Paris Est Créteil, 61 avenue du Général de Gaulle, Créteil, Val-de-Marne, 94000, France

⁷Département d'hématologie et d'immunologie, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, Créteil, Val-de-Marne, 94010, France

⁸Département d'hématologie biologique, AP-HP, Hôpital Bicêtre, 78 Rue du Général Leclerc, Le Kremlin-Bicêtre, Val-de-Marne, 94270, France

⁹Red Cell Disease Referral Center - UMGG, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, Créteil, Val-de-Marne, 94010, France

¹⁰Laboratoire Hématopoïèse et Immunologie (HEMATIM) EA4666, Université Picardie Jules Verne, 51 Boulevard de Châteaudun, Amiens, Hauts-de-France, 80000, France

¹¹Service d'Hématologie Biologique, CHU d'Amiens, 1 rond-point du Professeur Christian Cabrol, Amiens, Hauts-de-France, 80000, France

¹²Service de Génétique Constitutionnelle, CHU d'Amiens, 1 rond-point du Professeur Christian Cabrol, Amiens, Hauts-de-France, 80000, France

Correspondence

Lamisse Mansour-Hendili, Département de Génétique, Hôpital Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre De Tassigny, Créteil, F-94010, France.

Email: lamisse.mansour-hendili@aphp.fr

ORCID

Lamisse Mansour-Hendili  <https://orcid.org/0000-0001-7887-9156>

Guillaume Bouyer  <https://orcid.org/0000-0002-5808-0539>

Ariane Lunati  <https://orcid.org/0000-0002-8425-431X>

Loïc Garçon  <https://orcid.org/0000-0002-4002-2461>

REFERENCES

- Picard V, Guitton C, Thuret I, et al. Clinical and biological features in PIEZO1-hereditary xerocytosis and Gardos-channelopathy: a retrospective series of 126 patients. *Haematologica*. 2019;104(8):1554-1564. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.205328>
- Kaestner L, Bogdanova A, Egee S. Calcium channels and calcium-regulated channels in human red blood cells. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1131:625-648. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_25
- Fermo E, Bogdanova A, Petkova-Kirova P, et al. 'Gardos Channelopathy': a variant of hereditary stomatocytosis with complex molecular regulation. *Sci Rep*. 2017;7(1):1744-1744. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01591-w>
- Fermo E, Mondedero-Alonso D, Petkova-Kirova P, et al. Gardos channelopathy: functional analysis of a novel KCNN4 variant. *Blood Adv*. 2020;4(24):6336-6341.
- Mansour-Hendili L, Aissat A, Badaoui B, et al. Exome sequencing for diagnosis of congenital hemolytic anemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15(1):180. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01425-5>
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Crary SE, Buchanan GR. Vascular complications after splenectomy for hematologic disorders. *Blood*. 2009;114(14):2861-2868. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-210112>
- Khan PN, Nair RJ, Olivares J, Tingle LE, Li Z. Postsplenectomy reactive thrombocytosis. *Proc Bayl Univ Med Cent*. 2009;22(1):9-12.
- Mattheij NJ, Braun A, van Kruchten R, et al. Survival protein anoctamin-6 controls multiple platelet responses including phospholipid scrambling, swelling, and protein cleavage. *FASEB J*. 2015;30:727-737. <https://doi.org/10.1096/fj.15-280446>
- Wolfs JL, Wielders SJ, Comfurius P, et al. Reversible inhibition of the platelet procoagulant response through manipulation of the Gardos channel. *Blood*. 2006;108(7):2223-2228. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-009613>
- Seiler S, Arnold AJ, Grove RI, Fifer CA, Keely SL, Stanton HC. Effects of anagrelide on platelet cAMP levels, cAMP-dependent protein kinase and thrombin-induced Ca⁺⁺ fluxes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;243(2):767-774.

4.6.4.1.2.2 Résultats et discussion article 4

Ce patient est porteur d'une nouvelle variation du gène *KCNN4* (p.A322V) identifiée par SHD et classée comme pathogène grâce aux résultats des études fonctionnelles. À ce jour, seul un nombre limité de patients avec un syndrome de Gardos ont été rapportés et aucun événement thrombotique n'a encore été rapporté chez les patients splénectomisés. Ceci est assez surprenant car les mutations de *KCNN4* entraînent une hémolyse intravasculaire qui n'est pas améliorée par la splénectomie. La persistance de niveaux élevés d'hémolyse après splénectomie est un facteur de risque connu d'événement thrombotique (Crary and Buchanan, 2009; Khan et al., 2009). A l'inverse, de nombreux patients avec DHSt mutés *PIEZO1* ont développé une thrombose après splénectomie. Notre observation montre que la canalopathie de type Gardos peut aussi se compliquer d'épisodes de thrombose veineuse et artérielle. Le rôle exact de la thrombocytose dans la survenue d'une thrombose chez notre patient reste incertain. Cependant il faut noter que la numération plaquettaire a augmenté dès l'âge de 10 ans soit juste après la splénectomie alors que le premier événement thrombotique n'est survenu que 20 ans plus tard. Nous ne pouvons pas complètement exclure que le patient puisse avoir une thrombocytémie essentielle (TE) en plus de sa canalopathie de type Gardos (la biopsie de la moelle osseuse n'ayant pas été réalisée pour exclure définitivement la TE), mais cela semble hautement improbable. Tous les tests effectués à ce jour (myélogramme, résultats SHD myéloïde) n'ont pas permis de poser un diagnostic SMD ou SMP associé. Le bilan de thrombophilie n'a trouvé aucune autre cause évidente de thrombose chez ce patient. L'implication du canal Gardos dans l'activation plaquettaire est étayée par des données expérimentales (Wolfs et al., 2006; Nj et al., 2016). Chez notre patient, l'effet bénéfique de l'anagrélide peut être expliqué par ses propriétés antiagrégantes intrinsèques et par la modulation des concentrations intracellulaires de calcium (Seiler et al., 1987), pouvant moduler l'activité du canal Gardos. Davantage d'observations sont nécessaires pour évaluer avec précision le risque d'événements thrombotiques dans les canalopathies de type Gardos. Cependant, des précautions (y compris un suivi attentif avec des tests plaquettaires et de coagulation approfondis) semblent déjà nécessaires en cas de splénectomie chez les patients Gardos.

4.6.4.2 Cas des associations de variants

4.6.4.2.1 Patients 1 et 1'

Des échantillons sanguins des patients 1 et 1' ont été envoyés à Roscoff et étudiés. Une étude de la morphologie des globules rouges a été réalisée et les images traitées par ImageJ®. Le VGM du père était de 102 et celui du fils VGM de 112. La surface projetée des cellules a été définie et montre une surface projetée des GR du fils plus importante que celle du père (Figure 63). La surface projetée des cellules est plus importante chez les deux patients par rapport au témoin mais avec des cellules plus petites pour le père et un contenu en eau identique chez le père par rapport au témoin et à son fils (écarts types importants liés au faible volume) (Figure 64).

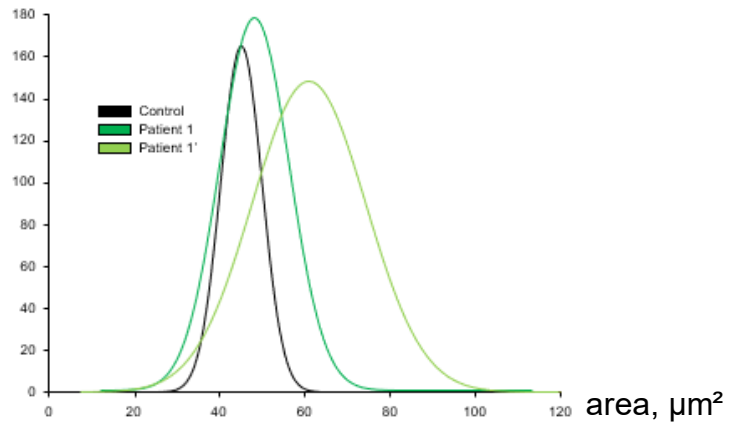


Figure 63 : Surface projetée des GR des patients 1 et 1'

Nombre de cellules en fonction de l'aire

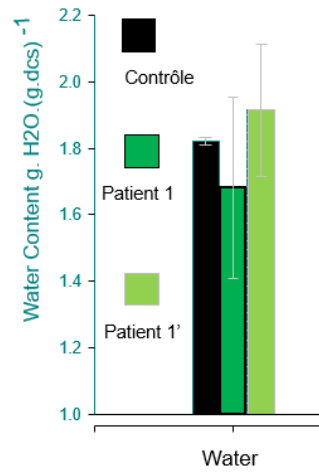


Figure 64 : Mesure du contenu en eau des GR du contrôle, des patients 1 et 1'

La circularité des cellules est très altérée chez les deux patients. Ce paramètre indique clairement que le nombre de cellules aux formes aberrantes est très important chez les deux patients (Figure 65).

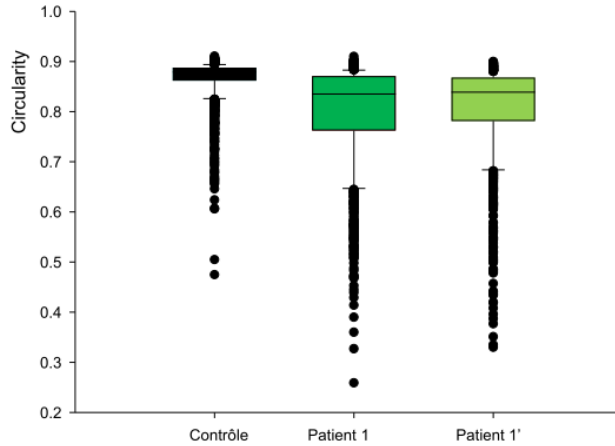


Figure 65 : Circularité des GR du contrôle, du patient 1 et du patient 1'

On note sur la mesure du potentiel de membrane en technique CCCP avec ajout de $10\mu\text{M}$ de A23187 (Figure 66) une hyperpolarisation moins importante chez le patient 1 que le patient 1'. Ceci pourrait être dû à une activité Gardos moins importante, ou à un moindre nombre de canaux Gardos disponible ou encore à moins de Calcium mobilisable dans la cellule ou moins de potassium dans les cellules du père. La pente de repolarisation (signe de l'activité des canaux cationiques non sélectifs dont fait partie PIEZO1) est moins importante chez le patient 1 que chez le patient 1'. La pente de repolarisation est similaire à celle du témoin (Figure 66). Chez les patients avec mutation activatrice de *KCNN4* on observe communément dans cette manip (données non publiées de l'équipe du Dr Egée) une pente de repolarisation plus importante chez les patients Gardos signant une suractivation des canaux cationiques non sélectifs.

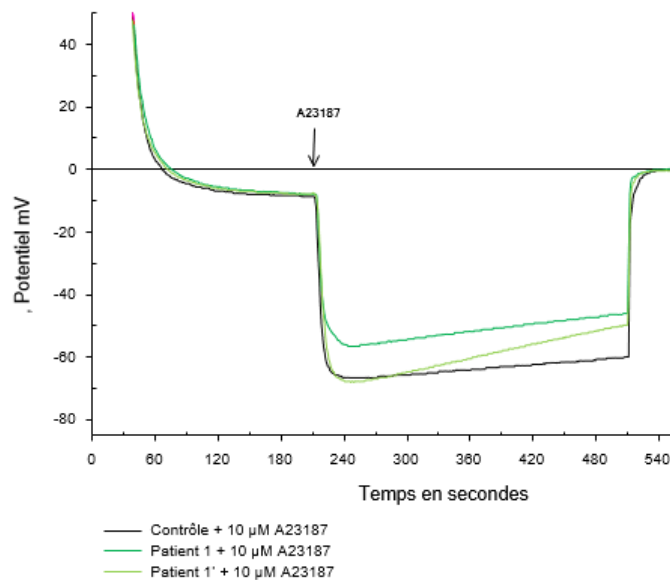


Figure 66 : Mesure des variations du potentiel de membrane du GR par la technique du CCCP avec ajout de $10\mu\text{M}$ de A23187 pour les patients 1 et 1'

Les expériences en NS309 (augmentant la sensibilité du Gardos au calcium) montrent clairement une hyperpolarisation plus importante chez les patients 1 et 1' par rapport au témoin signe d'une sortie massive de K⁺ due à l'activation plus importante des canaux Gardos liée à la mutation p.R352H (Figure 67 et Figure 68) indiquant que cette mutation induit une hypersensibilité du canal au calcium.

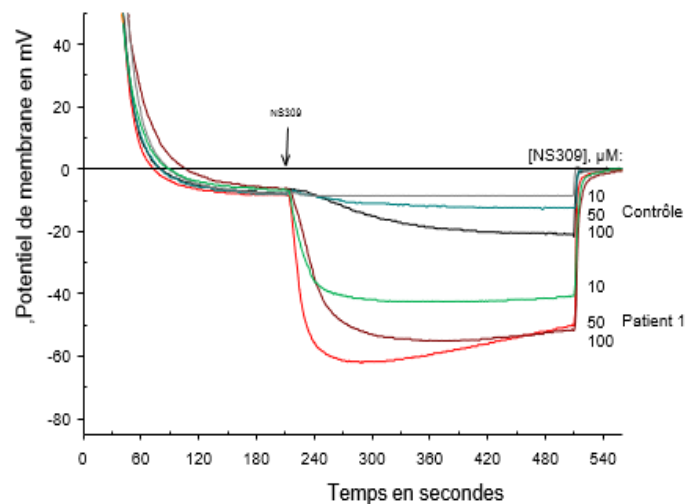


Figure 67 : Mesure des variations du potentiel de membrane du GR par la technique du CCCP avec ajout de NS309 à 3 concentrations différentes chez le patient 1

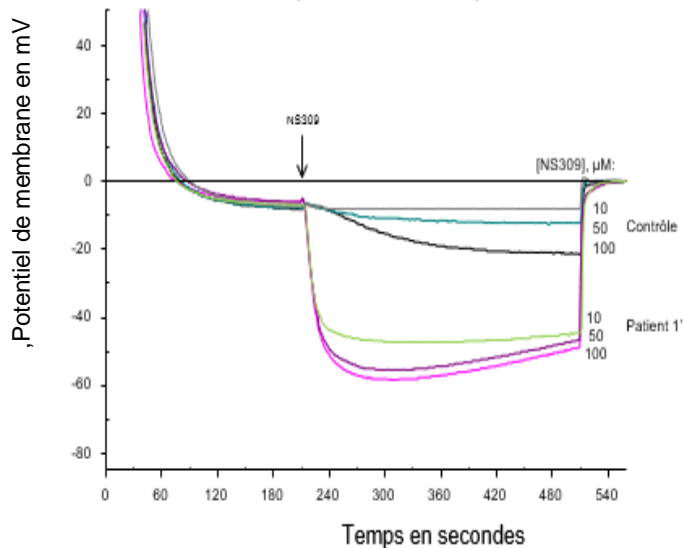


Figure 68 : Mesure des variations du potentiel de membrane du GR par la technique du CCCP avec ajout de NS309 à 3 concentrations différentes chez le patient 1'

Les différences constatées entre le patient 1 et le patient 1' (tous les deux splénectomisés) sont probablement dues à l'association chez le patient 1 du variant *PIEZO1*.

4.6.4.2.2 Patient 2

On observe une diminution du contenu en eau des globules rouges chez la patiente 2 SS + *PIEZO1* comparativement à un autre patient SS et un contrôle (Figure 69) signe d'une très forte déshydratation cellulaire.

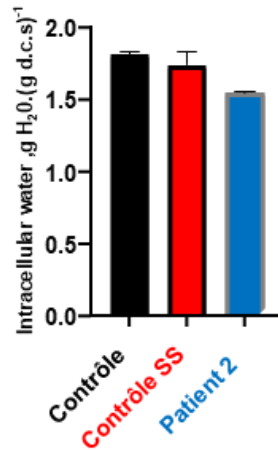


Figure 69 : Mesure du contenu en eau chez le patient 2 = SS + variant *PIEZO1*, chez un « contrôle » SS et chez un contrôle sain

Il est à noter que lors de l'arrivée des prélèvements à Roscoff une hémolyse très importante a été relevée sur le prélèvement de la patiente 2 (Figure 70).



Figure 70 : Aspect des plasmas à l'arrivée des tubes à Roscoff après centrifugation

L'expérience en A23187 qui active les canaux Gardos à leur maximum montre une hyperpolarisation moins importante chez la patiente par rapport à un témoin normal et un autre patient SS signant un contenu en potassium moins important (à mettre en regard de la très forte hémolyse observée chez cette patiente à l'arrivée des prélèvements à Roscoff), une activité Gardos plus faible ou moins de canaux Gardos. La pente de repolarisation est plus importante par rapport au témoin chez les deux patients SS probablement due à l'effet « P-sickle » (activation d'un cationique non sélectif non connu à ce jour chez les patients avec un syndrome drépanocytaire majeur de type S homozygote (Lew and Bookchin, 2005) (Figure 71).

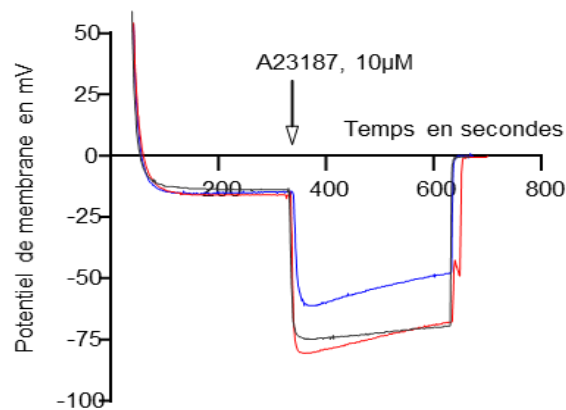


Figure 71 : Mesure des variations du potentiel de membrane du GR par la technique du CCCP après ajout de A23187 pour le patient 2

Contrôle en noir, Patient 2 en bleu, Contrôle SS en rouge

L'expérience en NS309 montre une hyperpolarisation moins importante chez la patiente 2 SS + *PIEZO1* due probablement à un contenu en K^+ moins important par rapport au témoin et à l'autre patient SS. La repolarisation est plus rapide chez la patiente SS + *PIEZO1* probablement à cause de la suractivation des canaux cationiques non sélectifs type *PIEZO1* existant chez les patients avec SDM comme chez le SS contrôle mais amplifié possiblement par le VSI *PIEZO1* associé (Figure 72).

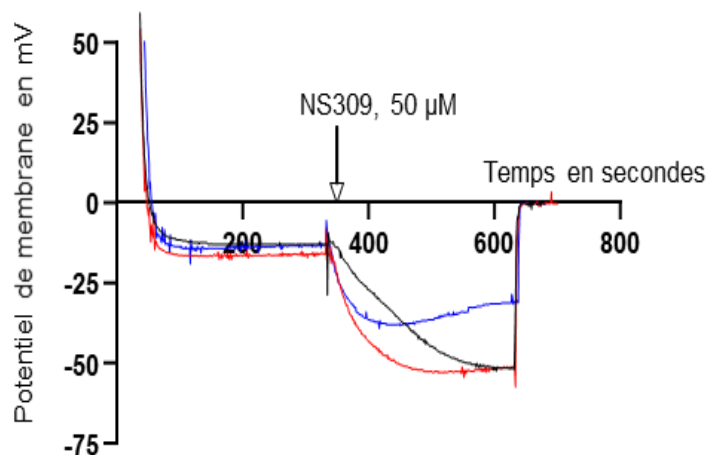


Figure 72 : Mesure des variations du potentiel de membrane du GR par la technique CCCP après ajout de NS309 à 50 μM

Contrôle en noir, Patient 2 en bleu, Contrôle SS en rouge

La très grande déshydratation des cellules érythrocytaires de la patiente 2 induit probablement un biais d'interprétation des techniques utilisées. Une mesure du contenu en K^+ des GR de cette patiente est en cours.

4.6.4.2.3 Patient 3

Les analyses réalisées en conditions A23187 et NS309 sont non conclusives chez ce patient 3 du fait des transfusions itératives et du contrôle envoyé en parallèle. Les données se sont révélées ininterprétables du fait de la non cohérence du témoin envoyé. Comparativement à un patient muté simplex *PIEZO1* (patient 4) pris comme contrôle positif, on voit chez ce patient :

- En conditions A23187 une hyperpolarisation comparable à celle du témoin signe de la même quantité de Gardos mais une pente de repolarisation plus importante chez le patient par rapport au témoin signant une activité cationique non sélective plus importante chez le patient par rapport au témoin signe d'une suractivation *PIEZO1*.
- En condition NS309 il y a un problème de reproductibilité du témoin rendant le test non interprétable

4.7 Tableau récapitulatif des résultats des associations

Patient	Cellules denses	LORRCA	CCCP et contenu en eau	Mutation
Patient 1	20%	Omin normal Ohyper diminué = déshydratation Eimax diminué : déformabilité diminuée, surface/volume diminué	Contenu en eau plus faible que patient 1' NS309 : suractivation Gardos A23187 : pente repolarisation moindre que patient 1' donc activité cationique non sélective moins suractivée	<i>KCNN4</i> c.1055G>A +/- <i>PIEZO1</i> c.3629C>T +/-
Patient 1'	10%	Omin diminué = augmentation résistance osmotique, Ohyper diminué = déshydratation, Eimax diminué	Contenu en eau idem contrôle voire plus important NS309 : suractivation Gardos A23187 : pente de repolarisation plus importante que le témoin et que son patient 1 suractivation cationique sélective plus importante comme chez patients mutés Gardos	<i>KCNN4</i> c.1055G>A +/-
Patient 2	30%	Eimax très faible % SS Aire très faible % SS Ohyper = 336 (bas = déshydratation)	Hémolyse +++, cellules très déshydratées, Contenu en eau très faible A23187 : hyperpolarisation moins importante que l'autre SS testé = moins de Gardos ou moins de K ⁺ dans les cellules Mais Pente de repolarisation plus importante en faveur suractivité cationique non sélective NS309 moindre hyperpolarisation : moins de Gardos ou moins de K ⁺ ou incapacité à faire sortir du KCl car cellule trop déshydratée	<i>PIEZO1</i> c.5089C>T +/- <i>PIEZO1</i> c.1031C>T +/- <i>SPTA1</i> c.3064A>T +/- <i>HBB</i> c.20A>T +/+
Patient 3	2%	Plus complexe car pas de bon contrôle	Il n'y a pas de gain de fonction visible sur les manipulations effectuées. A pondérer par le fait que le patient est transfusé très fréquemment donc difficile d'interpréter les tests. Contrôle inadapté deux fois (même contrôle)	<i>PIEZO1</i> c.6056G>A +/- <i>SPTB</i> c.2759C>T +/- <i>SPTA1</i> c.6531-12C>T +/- <i>HBB</i> c.92+6T>C +/- <i>HBB</i> c.315+1G>A +/-

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des résultats des explorations réalisées chez les patients avec des associations de variants

5 Conclusions

5.1 SHD et AHC

L'utilisation et la démocratisation du SHD dans la prise en charge diagnostique des pathologies du GR permettent d'aboutir à des diagnostics, de mettre en évidence des associations de variations d'intérêt mais accélèrent en parallèle l'émergence de variations de signification incertaine. L'analyse ne se faisant plus de manière séquentielle mais parallèle, l'association de variations dans des gènes différents est de plus en plus fréquente. Dans notre laboratoire nous rendons plusieurs variations d'intérêt dans 30% de nos comptes rendus positifs. Il s'agit la plupart du temps de VSI. Nous avons choisi de développer 3 cas d'intérêt d'associations de variations qui ont pu bénéficier d'études complémentaires. Le gène *PIEZO1* ainsi que le gène *SPTA1* sont les gènes les plus fréquemment mutés dans notre pratique comme l'indique également ce travail récent d'une équipe italienne (Andolfo et al., 2021). *PIEZO1* et *SPTA1* sont de grands gènes (51 exons et 52 exons) très polymorphes. Dans les 3 cas d'intérêt décrits dans ce travail, les patients portent un VSI du gène *PIEZO1* en plus de leur variant principal. Il est important de classer ces variants *PIEZO1* car la présence d'un variant pathogène gain de fonction à l'état hétérozygote contre indique à priori une splénectomie. L'association de variations rend complexe l'étude fonctionnelle.

Le SHD permet donc de mettre en évidence ces associations potentiellement génératrices de modification de prise en charge thérapeutique dont la présence est invisible sur les uniques tests phénotypiques.

L'utilisation du SHD (type *whole genome sequencing*) ouvre également de nouvelles perspectives diagnostiques dans le monde des pathologies du GR. Nous avons pu grâce au génome résoudre un cas pédiatrique en errance diagnostique qui s'est révélé être une dysérythropoïèse congénitale syndromique due à une mutation *de novo* de *VPS4A*.

5.2 Etudes ARN

La mise en place d'étude ARN à partir d'ARN extrait de tubes Paxgene a permis de reclasser 11 variations.

Les difficultés rencontrées sont liées aux mises au point de l'étude de l'expression des gènes de référence qu'il faut réadapter au cas par cas selon le gène cible. Le gène *SPTA1* est un gène complexe à quantifier car produit en quantité 7 fois plus importante que nécessaire. Une quantification via des sondes fluomarquées est en cours de mise en place au laboratoire. L'utilisation d'un agent intercalant de type SYBR green ne semble pas adapté.

Les perspectives d'étude des ARN sont la mise en place de RNAseq par SHD aujourd'hui limité par les capacités bioinformatiques du site.

5.3 Etudes familiales

Les études génétiques familiales sont cruciales et permettent quand elles sont suffisamment étendues et associées au phénotypage des individus d'aboutir à des re-classifications de VSI. La principale limitation des études familiales est liée à l'accessibilité des apparentés. La mise en place d'un système de coordination infirmière des soins a permis au sein de notre groupe hospitalier de reconvoquer certains patients et dans certains cas des apparentés. Ces études ont permis de mettre en évidence la ségrégation du variant avec la pathologie ou inversement d'exclure la causalité du variant dans une pathologie donnée comme dans le cas de la famille *GATA1*. Il s'agit d'un outil puissant mais souvent difficile à mettre en œuvre et qui nécessite des moyens humains et de la persévérance.

5.4 Densité des GR

Nous avons montré par ce travail l'intérêt de l'étude de la densité des GR en gradient de phtalates comme outil de screening des pathologies de membrane du GR pour les patients de notre hôpital ou des sites de proximité. Nous observons des profils de courbes de densité anormaux chez les patients atteints de SH ou de DHSt. Nous disposons pour le moment de trop peu de cas pour mettre en œuvre une modélisation mathématique standardisée des déviations des courbes observées selon la pathologie voire le gène muté.

Cet outil s'avère efficace pour mettre en évidence un défaut de membrane du GR visible par un défaut d'hydratation des GR sur la courbe. Nous avons pu mettre en évidence l'intérêt de la mesure du taux de cellules denses dans l'étude post-génétique de certains patients présentant des associations de variations d'intérêt dans les gènes du GR. Des différences significatives du taux de cellules denses semblent corrélées à certaines différences génotypiques. Il s'agit donc d'un outil à la fois d'orientation diagnostique et de validation fonctionnelle de variants.

Cependant et comme pour la plupart des techniques d'étude *ex vivo* ou *in vitro* utilisées, le prélèvement et le contenant conduisent à l'obtention de résultats n'étant qu'un reflet très partiel de la réalité physiologique. Les conditions préanalytiques sont cruciales et doivent être respectées pour une interprétation satisfaisante des résultats. L'étude doit être réalisée dans les heures suivant le prélèvement sans stockage. Les résultats de stabilité à J1 même après stockage à +4°C peuvent modifier drastiquement les profils dans certaines pathologies du GR comme nous l'avons montré. Les limites sont donc liées à la technique elle-même utilisant un ester de phtalates toxique, non automatisable et aux conditions préanalytiques qui dans cette indication hors drépanocytose doivent être respectées de manière optimale.

5.5 LORRCA

Nous avons obtenu des profils de courbe compatibles à ceux publiés dans le cadre des pathologies de membrane du GR dites classiques et « simplex ». Concernant les études d'associations de variants, des différences fines sur certains paramètres peuvent être observées à condition de

disposer de contrôles appropriés (contrôle « négatif » et contrôle « positif » avec anomalie simplex en cas d'associations de variations). Nous avons montré chez les patients 1 et 1' qu'il existait une différence sur le paramètre Omin entre le père porteur d'une association de variants et le fils et pour le patient 2, SS avec variant *PIEZO1* quand on compare à un groupe de témoins SS avec des taux de cellules denses « normaux » on observe des différences.

Les conditions préanalytiques sont également importantes. En effet, les conditions de stockage peuvent modifier les profils initiaux observés à J0 tendant pour certaines pathologies vers une normalisation de certains profils avec le temps comme pour le syndrome de Gardos. Cette normalisation pourrait correspondre à une disparition des cellules les plus anormales qui sont les plus fragiles ou à une captation d'eau des cellules déshydratées qui retrouvent un contenu en eau proche de la normale (réhydratation des cellules). Il faudrait dans l'idéal effectuer cette étude le jour du prélèvement, sans stockage, afin de préserver au maximum les propriétés des GR en conservant les GR les plus fragiles. L'utilisation concomitante d'un témoin normal prélevé le jour même et stocké dans les mêmes conditions ne permet pas de s'affranchir de ce problème. L'exemple de la mutation *KCNN4* p.R352H publiée et republiée avec des profils d'osmoscan normaux en est l'illustration. Il est probable que ces tests n'ont pas été effectués le jour du prélèvement mais après un stockage et/ou un transport. Nous obtenons des profils en osmoscan profondément altérés et pathologiques à J0 chez des patients porteurs de cette mutation *KCNN4* p.R352H contrairement aux profils publiés.

5.6 ROSCOFF

Les études fonctionnelles réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr Egée à Roscoff ont permis de mettre en évidence des profils interprétables et conclusifs pour des cas « simplex » de pathologie de membrane du GR comme celui publié dans l'*AJH* en 2021 concernant la mutation p.A322V de *KCNN4* où un seul variant d'intérêt avait été identifié dans le gène *KCNN4*.

Dans les cas d'associations de variants que nous avons détaillées, les résultats de ce travail, présentés par ordre croissant de complexité, rendent compte des limites de cette technique. Pour les patients 1 et 1', une différence a pu être mise en évidence entre le père et le fils sur certains paramètres comme la pente de repolarisation dans le test avec le A23187 ou pour la patiente 2, SS avec *PIEZO1* sur le contenu en eau des cellules. Pour le patient 3, la fréquence des transfusions et l'envoi d'un témoin inadéquat n'a pas permis de conclure. Ces tests peuvent permettre également avec un choix adéquat de contrôles (intra familial pour la famille 1 et témoin SS avec taux de cellules denses normal pour la patiente 2) de mettre en évidence des différences fines en cas d'association de variants et sont très efficaces pour les mutations *PIEZO1* et *KCNN4* simplex.

6 Discussion générale et perspectives

De nombreuses publications mettent en avant l'utilité du SHD dans la prise en charge des AHC, y compris les sphérocytoses héréditaires dont le diagnostic historique est basé sur les seuls tests phénotypiques (Bianchi et al., 2020; Russo et al., 2020; Steinberg-Shemer and Tamary, 2020). Le SHD permet d'aboutir à un diagnostic dans 65% des cas d'anémies hémolytiques tout venant (Mansour-Hendili et al., 2020). Les recommandations diagnostiques tardent à évoluer dans le sens d'une priorisation du SHD. En outre, le problème du diagnostic différentiel est très peu évoqué dans la publication princeps concernant les recommandations de prise en charge diagnostique des AHC (King et al., 2015). Il existe cependant de nombreux recoupements phénotypiques et les seuls tests phénotypiques ne permettent pas de distinguer certaines pathologies : exemple du déficit en pyruvate kinase et de la dysérythroïse congénitale (Russo et al., 2018), exemple de la sphérocytose héréditaire et de la CDA2 (Danise et al., 2001; Singleton et al., 2018). Par ailleurs les associations de variations ne peuvent pas être mises en évidence par les tests phénotypiques seuls en première intention. L'utilisation du SHD en parallèle des tests phénotypiques plutôt qu'en seconde intention permettrait de mettre en évidence à la fois des associations de pathologies et la présence de polymorphismes modulateurs (Russo et al., 2020). Comme d'autres équipes, nous proposons un reclassement de la génétique moléculaire par SHD dans la prise en charge des AHC en parallèle des tests phénotypiques, mettons en avant l'intérêt des exomes et du génome entier dans certains cas et présentons une démarche de validation fonctionnelle de VSI.

Comme dans les autres pathologies mendéliennes le SHD met en évidence de nombreux variants de signification incertaine qui nécessitent la mise en place de stratégies de validation fonctionnelle pour les reclassifier. D'un point de vue purement génétique la reclassification des VSI représente aujourd'hui un challenge scientifique d'intérêt public comme l'énonçait Cutting déjà en 2014 (Cutting, 2014).

Des plateformes de génomique fonctionnelle communes devraient voir le jour dans les prochaines années en France sous la pression notamment des résultats issus des premiers séquençages de génome entier dans le cadre du PFMG2025. Le plan national maladies rares 4 s'oriente également dans ce sens. En attendant la mise en place et le déploiement de ces plateformes il est indispensable de réfléchir à la mise en place de stratégies pragmatiques, efficaces permettant d'aboutir pour certains patients à une réponse concernant les VSI. C'est le sens de ce travail et des efforts fournis par les différents intervenants.

Le globule rouge, de par sa facilité d'accès, demeure un modèle relativement simple à étudier. Notre travail a démontré que les tests phénotypiques du GR utilisés comme outils diagnostiques ou de suivi comme le LORRCA ou la mesure de la densité des GR en gradient de phtalates peuvent être utilisés comme tests fonctionnels en aval de la génétique dans une stratégie de validation

fonctionnelle de variants de signification incertaine. Pour les cas dits « simplex » où une seule variation d'intérêt causale a été identifiée leur intérêt a été démontré et a fait l'objet d'une publication (Mansour-Hendili et al., 2021). Ces techniques utilisées dans notre travail : LORRCA, densité des GR en gradient de phtalates, mesure du potentiel par méthode CCCP ou Membrane Potential Estimation (Macey-Bennekou-Egée méthode), mesure du contenu en eau des GR... ont lieu *in vitro* où il y a forcément une « déformation » de la réalité physiologique due au prélèvement et au « choc » face au contenant. Une étude *in vivo* serait nécessaire bien que cela semble aujourd'hui irréaliste. Dès la ponction veineuse et le recueil du sang à travers une tubulure vers un tube, les globules rouges changent d'environnement et ne sont plus soumis aux mêmes contraintes. L'avenir de ces techniques réside sûrement dans le développement de nouvelles techniques d'études des flux membranaires *ex vivo* reproduisant des schémas veineux et basés sur la microfluidique (Favre et al., 2020; Man et al., 2021; Piety et al., 2021; Xu et al., 2020), celles-ci pourraient être plus proches de la réalité physiologique. Ces techniques ne sont pas utilisées en pratique courante aujourd'hui. L'interférence entre le contenant et le GR est probablement à l'origine de la façon d'appréhender et de décrire les formes pathologiques des GR qui servent de classification initiale à certaines pathologies de membrane du GR. En effet, une étude récente de 2021 montre que l'étude en deux dimensions classique sur frottis sanguin de la morphologie des GR n'est probablement pas le reflet de la réalité physiologique (Simionato et al., 2021a). Cette équipe préconise un renommage des pathologies du GR basée non pas sur la morphologie des GR mais sur le défaut moléculaire causal. Cependant les techniques d'imagerie en deux dimensions sont en pleine évolution technologique et l'utilisation d'intelligence artificielle pourrait nettement améliorer les performances (Cheuque et al., 2022; Lee et al., 2021; Molina et al., 2021).

Les résultats de notre travail comme d'autres (Kaestner and Bianchi, 2020) ont montré la nécessité de réaliser « extemporanément » ces techniques pour afin d'obtenir le résultat le plus proche possible de la réalité physiologique illustré notamment par la mutation *KCNN4* p.R352H. Pour cantonner cette contrainte fonctionnelle plusieurs options sont possibles : utiliser des prélèvements témoins voyageant dans les mêmes conditions que celui du patient, déplacer le patient vers le site du laboratoire expert réalisant l'étude fonctionnelle ou au contraire faire en sorte que le laboratoire se déplace vers les patients. La première option est pour ainsi dire obligatoire, l'utilisation de témoins adéquats étant indispensable en biologie et notamment pour les techniques étudiant les flux ioniques et les contenus hydriques et ioniques, leur choix judicieux permet d'étudier les cas présentant des associations de VSI et ils demeurent vitaux pour les techniques imposant des délais vers des collaborateurs. Il faut réfléchir en amont au juste contrôle. Les témoins positifs/négatifs (par exemple des porteurs d'une seule des variations retrouvées dans une famille) dans les cas d'association que l'on peut trouver au sein d'une même famille sont indispensables pour certaines études. Ce point remet en perspective les difficultés potentielles liées aux reconvocations de patients et des apparentés. La présence et l'implication d'une infirmière de coordination a permis ce travail. Cette démarche est de longue haleine mais

est cruciale quand on parle d'étude génétique et de validation de VSI. En effet l'étude de la ségrégation familiale du variant corrélée au phénotype a montré dans notre travail (exemple de la mutation *GATA1*) sa puissance. C'est un outil abordable à ne pas négliger dans les études fonctionnelles. La seconde solution visant à faire se déplacer le patient vers le lieu de réalisation de la technique est envisageable mais n'est pas généralisable à tous les cas dépendant de l'état du patient, de sa disponibilité et de la localisation des différents experts. La dernière proposition énoncée dans l'article de Kaestner et Bianchi en 2020 (Kaestner and Bianchi, 2020) est celle d'un laboratoire mobile du GR comme il existe des laboratoires mobiles d'infectiologie (Weidmann et al., 2018) ou comme existent en médecine des projets mobiles comme l'avion Orbis en ophtalmologie ([Orbis | Fighting Global Blindness | Orbis UK Homepage](#)) défini comme un « flying eye hospital » combattant les causes curables de cécité partout dans le monde. Un tel projet serait réalisable pour un laboratoire du globule rouge avec les fonds adéquats.

Il existe également des limites liées aux techniques *per se*. En effet dans le cas de la mesure de la densité des GR en gradient de phtalates, il s'agit d'une technique non automatisable, utilisant un produit toxique et ne donnant de résultats fiables que quand réalisée extemporanément ou au moins dans les heures suivants le prélèvement. Cette limitation avait été initialement relevée par Danon et Marikovsky en 1964 dans leur publication princeps. Il existe aujourd'hui des alternatives à cette technique avec des automates d'hématologie cellulaire permettant de rendre des taux de cellules denses. Ces techniques ne disposent pas aujourd'hui de la sensibilité et la spécificité de la méthode en phtalates. Des études de corrélation devraient être réalisées afin de valider ces techniques qui permettraient d'étendre l'utilisation de ce paramètre. Par ailleurs, le paramètre densité GR semble corrélé au degré de l'hémolyse intravasculaire et des marqueurs spécialisés de l'hémolyse comme l'hème libre pourraient remplacer dans quelques années ce paramètre si les études de corrélation confirment ce fait.

Notre travail propose un modèle de solutions accessibles pour la validation fonctionnelle de VSI via notamment la mise en place de réseaux collaboratifs. En attendant l'essor des plateformes de génomique fonctionnelle, l'avenir à court et moyen terme de la validation des VSI devrait passer par la mise en place de réseaux collaboratifs étendus et diversifiés (Figure 73). La collaboration illustrée dans ce travail par celle mise en place avec l'équipe du CNRS de Roscoff pour les VSI *PIEZO1* et *KCNN4* est pleine d'avantages. Nous ne pouvons pas (et n'avons pas les moyens humains ni financiers) mettre en place et mettre au point l'ensemble des tests fonctionnels nécessaires à la validation des VSI retrouvés en SHD. Une solution pragmatique est la collaboration en sachant faire appel à des équipes expertes d'un domaine précis permet de gagner en productivité et en rapidité de réponse. Par ailleurs, cette approche enrichit tous les partenaires à la fois sur le plan scientifique et humain.

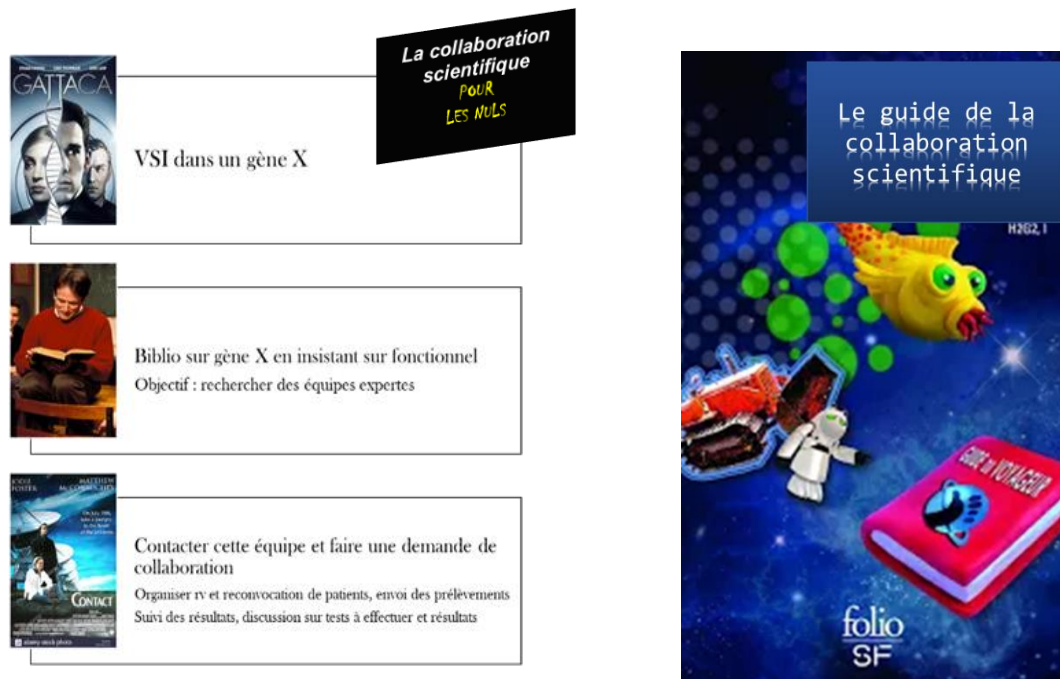


Figure 73 : « Workflow » de mise en place de collaboration

Les principales limites de cette approche collaborative résident dans le suivi et la gestion des envois de prélèvements liés également à la reconvoction de patients. L'ensemble des données fonctionnelles générées par toutes ces études au niveau national et international devrait être partagé sur une base de données en ligne ouverte aux professionnels du domaine. Ce vaste projet, vital pour la poursuite de ces activités, nécessite une réflexion commune et un audit des solutions existantes afin de permettre un partage sécurisé et simple d'accès (à la fois pour la soumission et la consultation des données). Ce type de projet existe au niveau international avec la base de données Clinvar et son pendant clinique Clingen. Les analyses multiplex fonctionnelles appelées MAVE (détaillées dans l'introduction de ce travail) vont dans ce sens en proposant la mise en place d'Atlas de variations génomiques avec l'effet fonctionnel de chaque variation répertoriée dans ces atlas et accessible à la communauté scientifique.

7 ANNEXES

7.1 Annexe 1 - Liste gènes panel membrane et CDA

ANK1
SPTB
SPTA1
SLC4A1
EPB42
EPB41
PIEZO1
KCNN4
STOM
RHAG
RHCE
ABCG5
ABCG8
LCAT
XK
ATP11C
ABCB6
HFE
UGT1A1
ALAS2
GATA1
HBB
HBA1
HBA2
HBG1
HBG2
CDAN1
CDIN1
SEC23B
KIF23
KLF1
SRY
PARP4
ALAS2
GLRX5
ABCB7
VPS4A
CAD
PRDX2
MVK
COX4I2
LPIN2
G6PD
PKLR

7.2 Annexe 2- Liste gènes panel AHC v1

HK1
GPI
PFKM
ALDOA
TPI1
PGK1
ENO1

PKLR
PGAM1
BPGM
SLC2A1
GALT
G6PD
PGD
CYB5R3
GSR
GSS
GPX1
GCLC
TXNRD1
TXNRD2
NT5C3A
AK1
ADA
GATA1
HBB
HBA1
HBA2
HBG1
HBG2
CDAN1
C15ORF41
SEC23B
CDAN3
KLF1
ANK1
SPTB
SPTA1
SLC4A1
EPB42
EPB41
PIEZO1
KCNN4
STOM
RHAG
RHCE
SLC4A1
ABCG5
ABCG8
LCAT
XK
ADAMTS13
CFH
CFHR3
CFHR1
CD46
CFI
CFB
C3
THBD
DGKE
CD59
FOXP3
ITK
FAS

FASLG
CASP10
LRBA
STIM1
UROS
CPOX
HMOX1
HFE
UGT1A1
PIGA
PIGT
ATP11C
BMP6
CP
FTH1
FTL
HAMP
HFE
HJV
SLC11A2
SLC40A1
TF
TFR2
TMPRSS6

7.3 Annexe 3 - Matériel et méthodes Genome Sequoia

STRATÉGIE D'INTERPRÉTATION :

Le périmètre effectif de l'analyse peut être appelé à évoluer dans le temps pour un même examen. A titre indicatif :

Palier 1 : Gènes connus pour être impliqués dans la pré-indication : régions codantes et introniques flanquantes des transcrits canoniques

Palier 2 : Gènes connus pour être impliqués dans la pré-indication : régions introniques, 5'UTR, 3'UTR, régulatrices des transcrits canoniques, transcrits alternatifs

Palier 3 : Gènes connus pour être impliqués en pathologie mendélienne et/ou gènes en lien avec les termes HPO

Palier 4 : Gènes codant les protéines, non connus pour être impliqués en pathologie humaine

Palier 5 : Tout autre sous-ensemble ou région génomique.

POLITIQUE DE RESTITUTION DES RÉSULTATS :

La classification des variations ponctuelles est basée sur les recommandations de l'ACMG (PMID : 25741868) et du réseau NGS-DIAG (19/12/2017).

La classification des variations du nombre copie est basée sur les recommandations nationales du réseau AChro-Puce.

Seuls les variants pathogènes (classe 5) et probablement pathogènes (classe 4) figurent dans le compte rendu d'examen.

Les variants de signification incertaine (classe 3) ne sont rapportés qu'en cas d'intérêt identifié en concertation avec le prescripteur.

Les autres variants de classe 3 sont disponibles sur demande du prescripteur.

Les régions non couvertes au seuil technique de validation ne sont pas réanalysées par une méthode complémentaire.

Les variants rapportés satisfont à des critères de qualité internes, mais ne sont confirmés ni par une méthode complémentaire, ni sur un second prélèvement.

Les réanalyses peuvent être effectuées à l'initiative du laboratoire ou sur demande du prescripteur, sous réserve d'accord préalable du laboratoire.

PERFORMANCES DE L'EXAMEN : SNV Indels ≤ 50pb CNV > 4kb Sensibilité analytique 99,5% 95% 57,7%

Valeur prédictive positive analytique

94,5%

94,5%

32,4%

Source : EMQN DNA sequencing- NGS- vGermline 2019

LIMITES DE L'EXAMEN :

Sensibilité et VPP analytiques ne font l'objet que d'une estimation.

Elles peuvent varier localement selon le contenu et la complexité des régions génomiques, ainsi que selon la quantité de donnée par échantillon.

En date du présent compte-rendu, l'examen ne détecte pas : les expansions nucléotidiques anomalies de méthylation ou autre modification épigénétique, les disomies, les variations de l'ADN mitochondrial, ni les variations de structure (SV) comprises entre 50 pb et 2kb.

La détection des variants à faible ratio allélique (VAF < 30%) ne peut être garantie.

Les conclusions présentes peuvent être révisées en raison de l'évolution continue de la littérature, des bases de données.

Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une maladie génétique.

MÉTHODE ANALYTIQUE :

Production des séquences : la quantification et la qualification des acides nucléiques sont respectivement obtenues sur Spark®, TECAN® et Fragment Analyzer®, Agilent®. Les fragments sont générés par sonication (LE220plus®, Covaris®). La sélection de taille, tout comme les étapes de purification subséquentes, sont réalisées sur billes magnétiques (Sera-Mag magnetic beads®, GE Healthcare®). La préparation de la librairie est effectuée sans amplification (NEBNext® Ultra II End repair/A-tailing module & Ligation module, New England Biolabs®). La librairie est quantifiée par qPCR (NEBNext® Custom 2X Library Quant Kit Master Mix, New England Biolabs®)

; QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System®, Life Technologies®). Les librairies sont séquencées en 'paired-end' (2 fois 150 cycles) par technologie SBS (Flow Cell S4, NovaSeq 6000®, Illumina®).

Analyse bioinformatique :

Versions: pipeline_demux_version: pipeline_demux_SeqOIA_v.3.2.2 ; pipeline_trio_wgs v3.2.1; snakefile_analysis_3.2.1; pipeline_config, v.3.2.1; cluster_config,v.3.2.1).

Méthodes : les fichiers de séquence (.BCL) sont démultiplexés (bcl2fastq®, v2.20.0.422, Illumina®). L'alignement des fichiers obtenus (.FASTQ) sur le génome de référence (GRCh38.92.fa (GRCh38, release-92, Jul 02 2018, ftp.ensembl.org) utilise une transformée de Burrows-Wheeler (BWA-MEM, 0.7.15). Le marquage des duplicats est effectué par Picard MarkDuplicates (2.8.1), la recalibration du score de qualité des bases par GATK4 (v4.1.6.0, Broad Institute). L'appel des SNVs (SNPs et INDELS) est effectué par GATK4 (v4.1.7.0, Broad Institute) puis sont annotés au moyen de SnpEff (4.3t) et SnpSift (4.3t) ; les bases de données interrogées sont les suivantes : SNPEff (v4.3t), 1000Genomes (phase3, v2013-05-02), gnomAD (exomes, v2.1.1), gnomAD (genomes, v3), ClinVar (v20190722), COSMIC (coding, v89), COSMIC (non-coding, v89), dbSNV (v1.1), dbSNP (v20180418), dbNSFP (v4.0), phastCons (v08-May-2015). L'appel des CNVs est effectué par CNVnator (v0.4.1, Mark B. Gerstein lab, Yale University) et l'annotation est effectuée par AnnotSV (v2.5.1) à partir des bases de données intégrées à cet utilitaire (v2.5).

7.4 Annexe 4 - Conditions des réactions ARN

tapestation	SCREENTAPE ARN	5067-5576
	TAMPON D'ECHANTILLON SCREENTAPE ARN	5067-5577
	LADDER SCREENTAPE ARN	5067-5578
quantus	QUANTIFLUOR RNA SYSTEM 1ML	E3310
RT	RNASE INHIBITOR 20 UNITS MUL 100 REACTIONS / 2000 UNITES	N8080119
	HC CDNA REVERSE TRANSCRIPTION 200T	4368814
PCR	GOTAQ G2 HOT START 5 X 500U	M7406
séquençage	BIGDYE TERMINATOR V3.1 READY REACT 1000T	4337456
purification	BIGDYE XTERMINATOR PURIFICATION KIT 50ML	4376484
QPCR	IPOWER SYBR GREEN PCR MASTER MIX 5ML / 200 REACTIONS	4367659

Fiche de suivi **Reverse Transcription**
 codification Kalllab : **HM-G-GEN-DE-ANA-122-v01**

ID opérateur:

Validation Technique Le: Par:

Commentaire:

Liste des échantillons : cf liste de travail RT

Calcul Volumes eau et ARN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CARN (ng/ul)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VARN (ul)	#DIV/0!	###	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
V eau Rnase free (ul)	#DIV/0!	###	#DIV/0!	###	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Quantité ARN (ng)					400					
V total (ul)					10					

Mix RT Date: Opérateur: **dans la glace**

garder les tubes vides et réactifs décongelés dans la glace
 distribuer dans les tubes l'eau, le mix puis l'ARN
 ne pas oublier le témoin négatif

lot kit RT: exp: lot RNAsine: exp:

	1	1		
Eau Rnase free	3.2	3.2	.25"	9min30
RT buffer 10X	2	2	37"	120min
RT Random Primers 10X	2	2	85"	5min
dNTP mix	0.8	0.8	4"	=
Reverse Transcriptase	1	1		
Rnase inhibitor	1	1		
VI mix	10			

les cDNA peuvent être conservés maximum 24h à 4°C au-delà ils sont stockés à -20°C

Dépôt sur gel T neg RT Date: Opérateur:

Conforme Non conforme

Numéro de manip:

Fiche de suivi:		RT-PCR-Séquençage		gène: _____																																																										
codification Kallitab :				NM: _____																																																										
N° de manipulation _____			ID opérateur _____																																																											
Validation Technique		Le _____			Par _____																																																									
Validation biologique		Le _____			Par _____																																																									
Commentaire _____																																																														
Liste des échantillons : cf feuille de travail																																																														
PCR																																																														
Date _____				Th _____																																																										
primers utilisés: _____																																																														
taille attendue: _____ pb																																																														
<table border="1"> <tr> <td>Go Taq</td> <td>1</td> <td>5</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Tampon promega</td> <td>4</td> <td>20,0</td> <td></td> <td>95°</td> <td>5min</td> </tr> <tr> <td>Dntp à 2mM</td> <td>2</td> <td>10,0</td> <td rowspan="4">25 cycles</td> <td>95°</td> <td>30 s</td> </tr> <tr> <td>MgCl2</td> <td>1,6</td> <td>8,0</td> <td>60°</td> <td>30 s</td> </tr> <tr> <td>primer 5' à 20pmol</td> <td>0,2</td> <td>1,0</td> <td>72°</td> <td>35 s</td> </tr> <tr> <td>primer 3' à 20pmol</td> <td>0,2</td> <td>1,0</td> <td>72°</td> <td>7 min</td> </tr> <tr> <td>H2O</td> <td>10,9</td> <td>54,5</td> <td></td> <td>10°</td> <td>∞</td> </tr> <tr> <td>Go Taq</td> <td>0,1</td> <td>0,5</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mix</td> <td>19</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>eDNA</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>						Go Taq	1	5				Tampon promega	4	20,0		95°	5min	Dntp à 2mM	2	10,0	25 cycles	95°	30 s	MgCl2	1,6	8,0	60°	30 s	primer 5' à 20pmol	0,2	1,0	72°	35 s	primer 3' à 20pmol	0,2	1,0	72°	7 min	H2O	10,9	54,5		10°	∞	Go Taq	0,1	0,5				Mix	19					eDNA	1				
Go Taq	1	5																																																												
Tampon promega	4	20,0		95°	5min																																																									
Dntp à 2mM	2	10,0	25 cycles	95°	30 s																																																									
MgCl2	1,6	8,0		60°	30 s																																																									
primer 5' à 20pmol	0,2	1,0		72°	35 s																																																									
primer 3' à 20pmol	0,2	1,0		72°	7 min																																																									
H2O	10,9	54,5		10°	∞																																																									
Go Taq	0,1	0,5																																																												
Mix	19																																																													
eDNA	1																																																													
Témoin Normal = _____																																																														
Electrophorèse sur gel d'agarose 2%																																																														
5µl de PCR pour 2µl de solution de Bleu de Bromophénol																																																														
Date _____																																																														
<table border="1"> <tr> <td>37°C</td> <td>15min</td> </tr> <tr> <td>80°C</td> <td>15min</td> </tr> <tr> <td>10°C</td> <td>∞</td> </tr> </table>						37°C	15min	80°C	15min	10°C	∞																																																			
37°C	15min																																																													
80°C	15min																																																													
10°C	∞																																																													
Purification PCR																																																														
Date _____				Th _____																																																										
5µL PCR + 2µL ExoSap																																																														
<table border="1"> <tr> <td>37°C</td> <td>15min</td> </tr> <tr> <td>80°C</td> <td>15min</td> </tr> <tr> <td>10°C</td> <td>∞</td> </tr> </table>						37°C	15min	80°C	15min	10°C	∞																																																			
37°C	15min																																																													
80°C	15min																																																													
10°C	∞																																																													
Marquage																																																														
Date _____				Th _____																																																										
<table border="1"> <tr> <td></td> <td>1</td> <td>5</td> <td></td> <td>96°C</td> <td>1min</td> </tr> <tr> <td>Big Dye</td> <td>0,5</td> <td>2,5</td> <td rowspan="5">25 cycles</td> <td>96°C</td> <td>10sec</td> </tr> <tr> <td>Tampon V3</td> <td>1,75</td> <td>8,75</td> <td>55°C</td> <td>5sec</td> </tr> <tr> <td>SN13/3N13</td> <td>0,1</td> <td>0,5</td> <td>60°C</td> <td>2min</td> </tr> <tr> <td>H2O</td> <td>7,15</td> <td>35,75</td> <td>10°</td> <td>∞</td> </tr> <tr> <td>Mix</td> <td>9,5</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>PCR purifiée</td> <td>0,5</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>							1	5		96°C	1min	Big Dye	0,5	2,5	25 cycles	96°C	10sec	Tampon V3	1,75	8,75	55°C	5sec	SN13/3N13	0,1	0,5	60°C	2min	H2O	7,15	35,75	10°	∞	Mix	9,5				PCR purifiée	0,5																							
	1	5		96°C	1min																																																									
Big Dye	0,5	2,5	25 cycles	96°C	10sec																																																									
Tampon V3	1,75	8,75		55°C	5sec																																																									
SN13/3N13	0,1	0,5		60°C	2min																																																									
H2O	7,15	35,75		10°	∞																																																									
Mix	9,5																																																													
PCR purifiée	0,5																																																													
Séquençage (Sanger 3130 XL)																																																														
Date _____																																																														
<input type="checkbox"/> SeqStudio POP1 <input type="checkbox"/> Seq2 POP6 <580pb <input type="checkbox"/> Seq1 POP7 >580pb																																																														
Analyse logiciel Seqscape V3 <input type="checkbox"/> Chromas <input type="checkbox"/>																																																														
Projet Template: _____																																																														
Validation Technique																																																														
Date _____																																																														
<table border="1"> <tr> <td>Contrôle de PCR Témoin Négatif sur gel</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Conforme</td> </tr> <tr> <td>Séquençage Témoin Normal</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Non conforme</td> </tr> <tr> <td>QV > 30 (1 sens) ou >20 (2 sens)</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td></td> </tr> </table>						Contrôle de PCR Témoin Négatif sur gel	<input type="checkbox"/>	Conforme	Séquençage Témoin Normal	<input type="checkbox"/>	Non conforme	QV > 30 (1 sens) ou >20 (2 sens)	<input type="checkbox"/>																																																	
Contrôle de PCR Témoin Négatif sur gel	<input type="checkbox"/>	Conforme																																																												
Séquençage Témoin Normal	<input type="checkbox"/>	Non conforme																																																												
QV > 30 (1 sens) ou >20 (2 sens)	<input type="checkbox"/>																																																													

Technique : **RT-QPCR** Gènes :

Date réalisation plaque: Date lancement du run:
 Opérateur :
 N°MANIP :

1) Liste des échantillons à diluer au 1/50e

	Nom	date de RT	dilution	vol CDNA	vol eau	position boîte de rangement
1	tem 1		1/50	2,0	98,0	cDna tem-
2	tem 2		1/50	2,0	98,0	cDna tem-
3	tem 3		1/50	2,0	98,0	cDna tem-
4	T neg		1/50	2,0	98,0	cDna tem-
5	pat 1		1/50	2,0	98,0	cDna -
6	pat 2		1/50	2,0	98,0	cDna -
7	pat 3		1/50	2,0	98,0	cDna -
8	pat 4		1/50	2,0	98,0	cDna -

ADN en triplicate (attention au volume nécessaire)

2) Préparation des mix PCR : Pièce PréPCR

(pour n+3 tubes)

REACTIFS Mix	vol en µL / 1 tube	10
Mix SYBR Green	10	100
Amorces F à 20 pmol/µl	0,5	5
Amorces R à 20 pmol/µl	0,5	5
H2O	4,6	46
Vol / puits	15	
cDNA dilué 1/50	5	

gène de réf: MPP1

210 PB
MPP1-cDNA-F / R

(pour n+3 tubes)

REACTIFS Mix	vol en µL / 1 tube	10
Mix SYBR Green	10	100
Amorces F à 20 pmol/µl	0,5	5
Amorces R à 20 pmol/µl	0,5	5
H2O	4,6	46
Vol / puits	15	
cDNA dilué 1/50	5	

1er gène d'intérêt

PB
si saut ex: pb
primers

(pour n+3 tubes)

REACTIFS Mix	vol en µL / 1 tube	10
Mix SYBR Green	10	100
Amorces F à 20 pmol/µl	0,5	5
Amorces R à 20 pmol/µl	0,5	5
H2O	4,6	46
Vol / puits	15	
cDNA dilué 1/50	5	

2eme gène d'intérêt

PB
si saut ex: pb
primers

(pour n+3 tubes)

REACTIFS Mix	vol en µL / 1 tube	10
Mix SYBR Green	10	100
Amorces F à 20 pmol/µl	0,5	5
Amorces R à 20 pmol/µl	0,5	5
H2O	4,6	46
Vol / puits	15	
cDNA dilué 1/50	5	

3eme gène d'intérêt

pb
si saut ex: pb
primers

(pour n+3 tubes)

REACTIFS Mix	vol en µL / 1 tube	10
Mix SYBR Green	10	100
Amorces F à 20 pmol/µl	0,5	5
Amorces R à 20 pmol/µl	0,5	5
H2O	4,6	46
Vol / puits	15	
cDNA dilué 1/50	5	

4eme gène d'intérêt

pb
si saut ex: pb
primers

Centrifuger la plaque à la réception

3) Allumer le LC480

Installer la plaque (centrifugée) sur le LC480
 Démarrer le run selon protocole Power SYBR Green V1 120619

Ref des réactifs utilisés :

Applied Master Mix Power Syber green (ref4367659) LOT :
 Plaque blanche opaque de 96 puits (ref 04729692001)
 Film spécial Light Cycler 480 (Sealing Foil) (ref 047729757001)

7.5 Annexe 5 - Descriptif des réactifs techniques ROSCOFF

Solutions normal Ringer:

154 mM NaCl, 2 mM KCl. Calcium Ringer: 154 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM

CaCl₂. Low Ionic Strength solution: 264 mM Sucrose, 2 mM KCl.

Drugs

CCCP (Sigma): (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone)

A23187 (Sigma): (calcymicin; 5-(methylamino)-2-[[[(2S,3R,5R,6S,8R,9R)-3,5,9-trimethyl-2-[(2S)-1-oxo-1-(1H-pyrrol-2-yl)propan-2-yl] -1,7-dioxaspiro[5.5]undecan-8-yl]methyl]-1,3-benzoxazole-4-carboxylic acid)

NS309 (Alomone): 6,7-Dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime

Yoda1 (Tocris): 2-[5-[[[(2,6-Dichlorophenyl)methyl]thio]-1,3,4-thiadiazol-2-yl]pyrazine

DMSO concentrations did not exceed 0.3%, which is known not to cause any effect in fluxes nor membrane potentials

Drugs

A23187 (calcymicin; 5-(methylamino)-2-[[[(2S,3R,5R,6S,8R,9R)-3,5,9-trimethyl-2-[(2S)-1-oxo-1-(1H-pyrrol-2-yl)propan-2-yl] -1,7-dioxaspiro[5.5]undecan-8-yl]methyl] -1,3-benzoxazole-4-carboxylic acid);

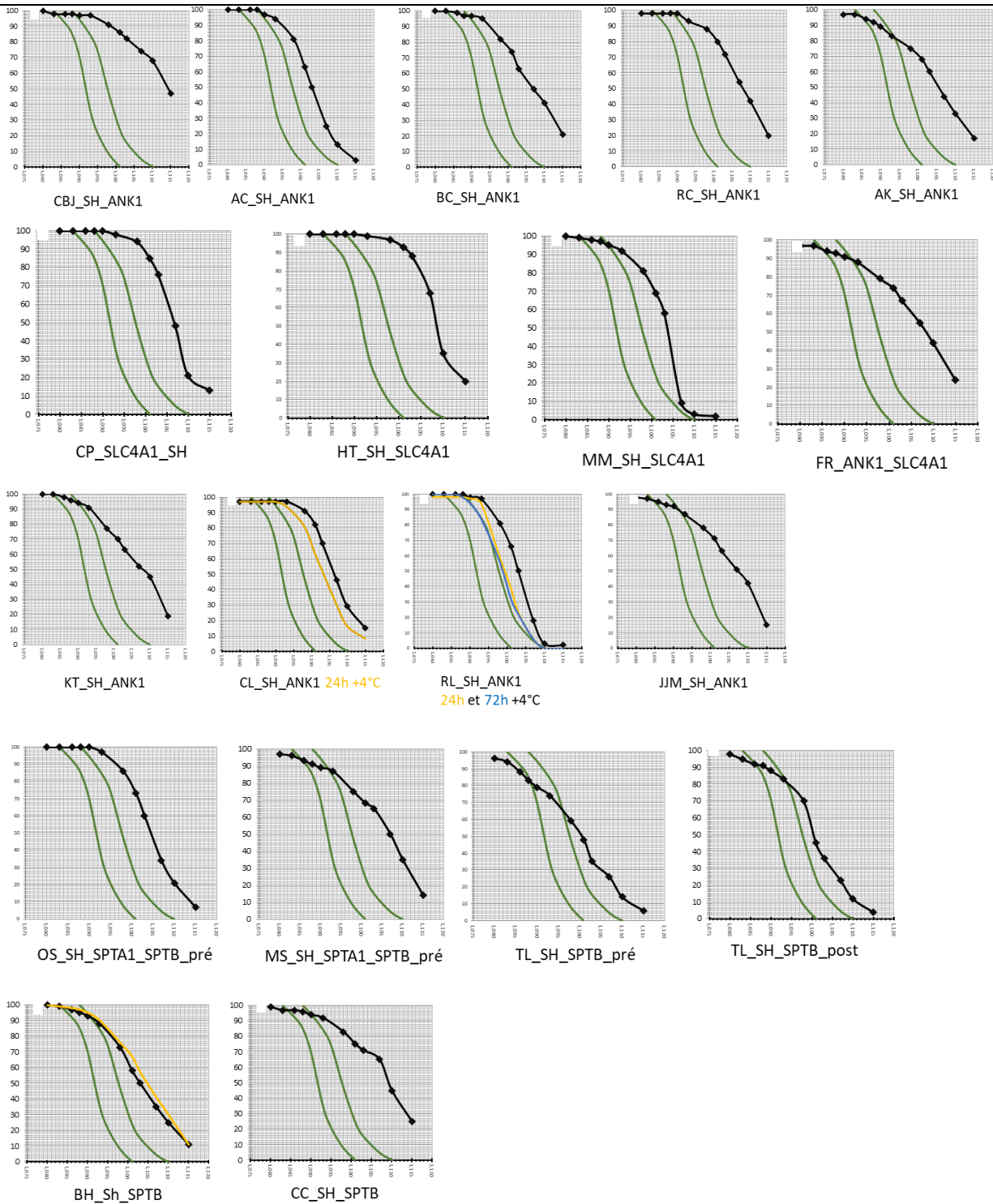
CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone), DIDS (4,4'-

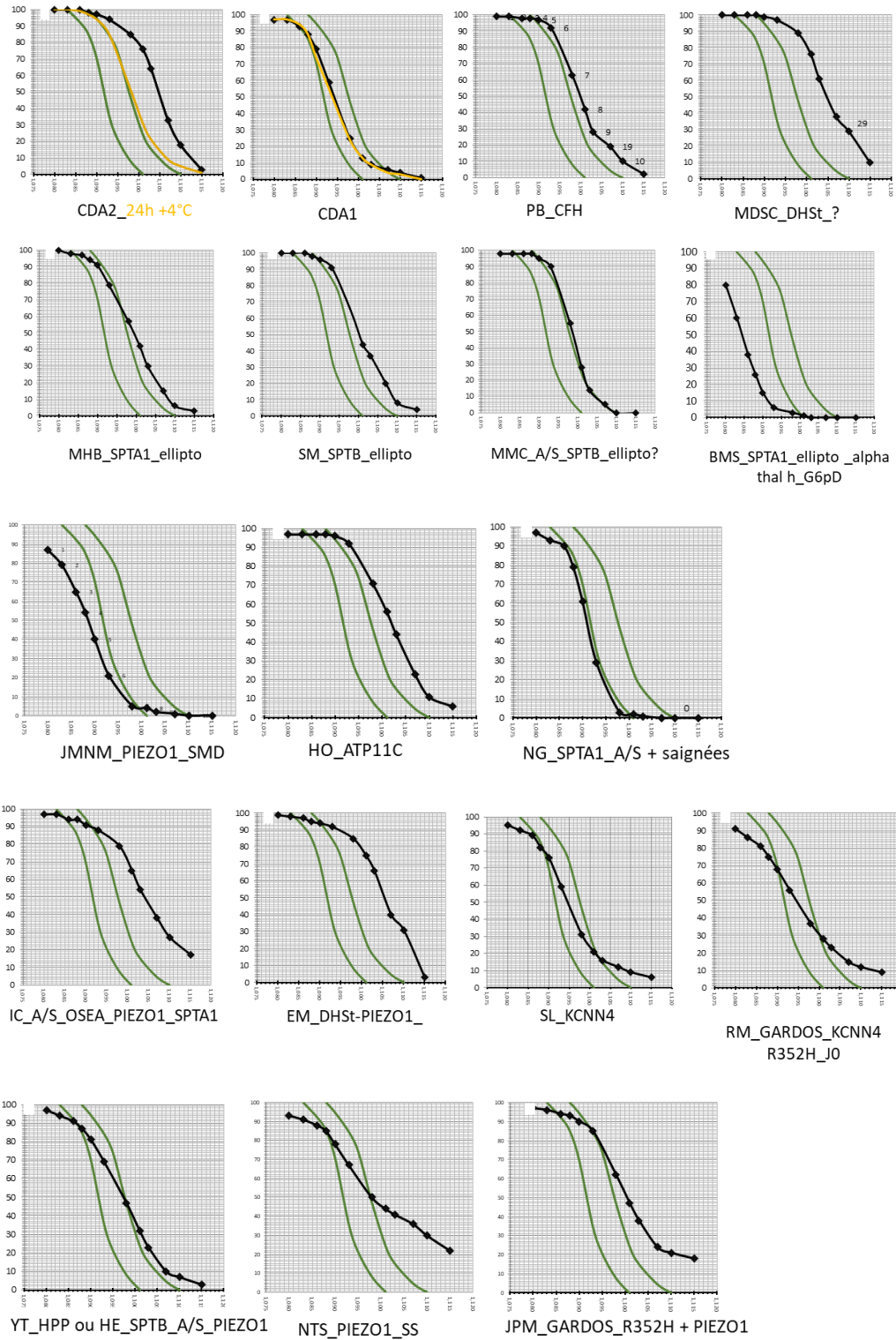
Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid) were purchased with Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France);

NS309 (6,7-Dichloro-1H-indole-2,3-

dione 3-oxime) were purchased with Tocris (France);

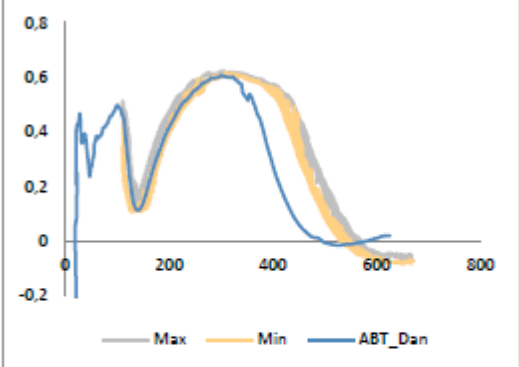
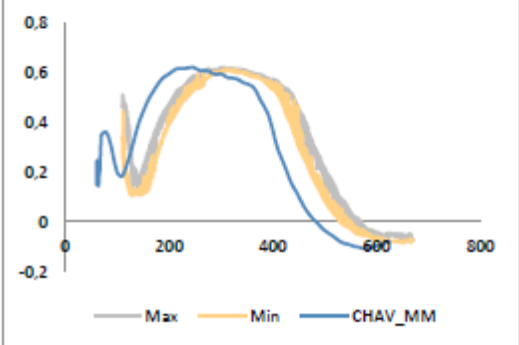
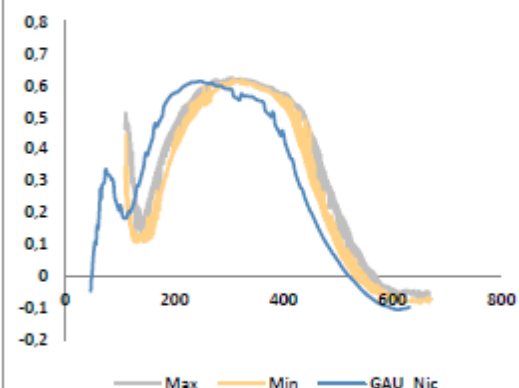
7.6 Annexe 6 - Profils courbe de densité des GR selon les pathologies





7.7 Annexe 7 - Profils LORRCA différents patients selon pathologie

ID	Mutation	Status	ACMG	Osmoscan curve
NKOT-MAP	PIEZO1 c.1126C>G (p.P376A) SMD	het	VUS	
CAR_Gr	ADK c.1012C>T (p.Arg338Cys) Anémie macrocytaire	hom	VUS	
SAL_Ma	ALAS2 c.-258C>G	het	VUS	

ID	Mutation	Status	ACMG	Osmoscan curve
ABT_Da	SEC23B : Exon 2 : c.40C>T (p.R14W). Exon 4 : c.325G>A (p.E109K). CDAll	Com. het	Pathogenic	
CHAV_M	SPTB : c.6706C>A (p.L2236M) c.6737C>T (p.A2246V) Elliptocytose? A/S + hémolyse	het cis	VUS	
GAU-Nic	SPTA1 c.1688G>A (p.R563Q) +alpha-Lely A/S Polyglobulie de vazquez + carence en fer induite par saignées + Elliptocytose ?	het	VUS	

ID	Mutation	Status	ACMG	Osmoscan curve
LEV_Tar	SPTB c.647G>A (p.R216Q) SH	het	Probably pathogenic	
HURT_Ben	SPTB c.3916C>T (p.R1306*) SH	het	Probably pathogenic	
LAV_Re	ANK1 c.5497C>T (p.Arg1833*) SH	het	Probably pathogenic	

ID	Mutation	Status	ACMG	Osmoscan curve
MART_JJ	ANK1 c.1A>G (p.M1V) SH	het	Probably pathogenic	
LEG_Cla	ANK1(NM_001142446 .1) c.1801-2A>C SH + HFE H63D/C282Y	het	Probably pathogenic	
PAT_Ca	SLC4A1 c.1458C>G (p.Tyr486*) SH	het	Probably pathogenic	

ID	Mutation	Status	ACMG	Osmoscan curve
BER_Pie	SLC4A1 c.1322T>G (p. Leu441Arg) SH	het	VUS	
TRA_He	SLC4A1 c.486-2A>G SH	het	Probably pathogenic	
OUAK_Hai. Jon	ATP11C c.2434C>T (p.Pro812Ser) ANK1 c.4558G>C p.Glu1520Gln	hem Het	VUS VUS	
IDEL_Om	PIEZO1 c.6262C>G (p.Arg2088Gly) heterozygote ND HIF1A c.1065A>T (p.Gln355His) heterozygote 0,0085% gnomAD		VUS Benign	

ID	Mutation	Status	ACMG	Osmoscan curve
AUR_Mel	<p><i>CDAN1</i> NM_138477.2 : c.2015C>T (p.Pro672Leu) à l'état hétérozygote dans l'exon 14 c.2602T>A (p.Phe868Ile) à l'état hétérozygote dans l'exon 19 c.3037T>G (p.Cys1013Gly) à l'état hétérozygote dans l'exon 23</p>			
CHIO_Rom	<p><i>ANK1</i> NM_020476.2c.4462C >T (p.R1488*) +/- exon 37</p>	het	Probably pathogenic	
KEB_Har	<p><i>HK1</i> NM_033496c.34C>T (p.R12*+/-) Exon 1</p>	hom	VUS	

8 References

- ; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L., 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 17, 405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Achour, A., Koopmann, T.T., Baas, F., Hartevelde, C.L., 2021. The Evolving Role of Next-Generation Sequencing in Screening and Diagnosis of Hemoglobinopathies. *Frontiers in Physiology* 12.
- Adzhubei, I., Jordan, D.M., Sunyaev, S.R., 2013. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet Chapter 7, Unit7.20*. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>
- Agarwal, A.M., Nussenzveig, R.H., Reading, N.S., Patel, J.L., Sangle, N., Salama, M.E., Prchal, J.T., Perkins, S.L., Yaish, H.M., Christensen, R.D., 2016. Clinical utility of next-generation sequencing in the diagnosis of hereditary haemolytic anaemias. *British Journal of Haematology* 174, 806–814. <https://doi.org/10.1111/bjh.14131>
- Aglialoro, F., Abay, A., Yagci, N., Rab, M.A.E., Kaestner, L., van Wijk, R., von Lindern, M., van den Akker, E., 2021. Mechanical Stress Induces Ca²⁺-Dependent Signal Transduction in Erythroblasts and Modulates Erythropoiesis. *Int J Mol Sci* 22, 955. <https://doi.org/10.3390/ijms22020955>
- Alaarg, A., Schiffelers, R., van Solinge, W., Van Wijk, R., 2013. Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia. *Frontiers in Physiology* 4.
- Alaimo, J.T., Grinton, K.E., Liu, N., Xiao, J., Yang, Y., Reid Sutton, V., Elsea, S.H., 2020. Integrated analysis of metabolomic profiling and exome data supplements sequence variant interpretation, classification, and diagnosis. *Genet Med*. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0827-0>
- Alanio-Bréchet, C., Schischmanoff, P.-O., Fénéant-Thibault, M., Cynober, T., Tchernia, G., Delaunay, J., Garçon, L., 2008. Association between myeloid malignancies and acquired deficit in protein 4.1R: a retrospective analysis of six patients. *Am J Hematol* 83, 275–278. <https://doi.org/10.1002/ajh.21088>
- Allen, S.J., O'Donnell, A., Alexander, N.D., Mgone, C.S., Peto, T.E., Clegg, J.B., Alpers, M.P., Weatherall, D.J., 1999. Prevention of cerebral malaria in children in Papua New Guinea by southeast Asian ovalocytosis band 3. *Am J Trop Med Hyg* 60, 1056–1060. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.1056>
- Andolfo, I., Alper, S.L., De Franceschi, L., Auriemma, C., Russo, R., De Falco, L., Vallefuoco, F., Esposito, M.R., Vandorpe, D.H., Shmukler, B.E., Narayan, R., Montanaro, D., D'Armiento, M., Vetro, A., Limongelli, I., Zuffardi, O., Glader, B.E., Schrier, S.L., Brugnara, C., Stewart, G.W., Delaunay, J., Iolascon, A., 2013a. Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1. *Blood* 121, 3925–3935, S1-12. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-482489>
- Andolfo, I., Alper, S.L., Delaunay, J., Auriemma, C., Russo, R., Asci, R., Esposito, M.R., Sharma, A.K., Shmukler, B.E., Brugnara, C., De Franceschi, L., Iolascon, A., 2013b. Missense mutations in

- the ABCB6 transporter cause dominant familialpseudohyperkalemia. *American Journal of Hematology* 88, 66–72. <https://doi.org/10.1002/ajh.23357>
- Andolfo, I., Martone, S., Rosato, B.E., Marra, R., Gambale, A., Forni, G.L., Pinto, V., Göransson, M., Papadopoulou, V., Gavillet, M., Elalfy, M., Panarelli, A., Tomaiuolo, G., Iolascon, A., Russo, R., 2021. Complex Modes of Inheritance in Hereditary Red Blood Cell Disorders: A Case Series Study of 155 Patients. *Genes (Basel)* 12, 958. <https://doi.org/10.3390/genes12070958>
- Andolfo, I., Russo, R., Gambale, A., Iolascon, A., 2018. Hereditary stomatocytosis: An underdiagnosed condition. *American Journal of Hematology* 93, 107–121. <https://doi.org/10.1002/ajh.24929>
- Andolfo, I., Russo, R., Gambale, A., Iolascon, A., 2016. New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. *Haematologica* 101, 1284–1294. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.142463>
- Andolfo, I., Russo, R., Manna, F., Shmukler, B.E., Gambale, A., Vitiello, G., Rosa, G.D., Brugnara, C., Alper, S.L., Snyder, L.M., Iolascon, A., 2015. Novel Gardos channel mutations linked to dehydrated hereditary stomatocytosis (xerocytosis). *American Journal of Hematology* 90, 921–926. <https://doi.org/10.1002/ajh.24117>
- Arashiki, N., Takakuwa, Y., 2017. Maintenance and regulation of asymmetric phospholipid distribution in human erythrocyte membranes: implications for erythrocyte functions. *Current Opinion in Hematology* 24, 167–172. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000326>
- Arias, Clemente Fernandez, Arias, Cristina Fernandez, 2017. How do red blood cells know when to die? *R. Soc. open sci.* 4, 160850. <https://doi.org/10.1098/rsos.160850>
- Arnold, D.M., Patriquin, C.J., Nazy, I., 2017. Thrombotic microangiopathies: a general approach to diagnosis and management. *CMAJ* 189, E153–E159. <https://doi.org/10.1503/cmaj.160142>
- Baron, M.H., Isern, J., Fraser, S.T., 2012. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* 119, 4828–4837. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-153486>
- Bartolucci, P., Brugnara, C., Teixeira-Pinto, A., Pissard, S., Moradkhani, K., Jouault, H., Galacteros, F., 2012a. Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis. *Blood* 120, 3136–3141. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-424184>
- Bartolucci, P., Brugnara, C., Teixeira-Pinto, A., Pissard, S., Moradkhani, K., Jouault, H., Galacteros, F., 2012b. Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis. *Blood* 120, 3136–3141. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-424184>
- Batista, J.V.G.F., Arcanjo, G.S., Batista, T.H.C., Sobreira, M.J., Santana, R.M., Domingos, I.F., Hatzlhofer, B.L., Falcão, D.A., Pereira-Martins, D.A., Oliveira, J.M., Araujo, Amanda S., Laranjeira, L.P.M., Medeiros, F.S., Albuquerque, F.P., Albuquerque, D.M., Santos, M.N., Hazin, M.F., Dos Anjos, A.C., Costa, F.F., Araujo, Aderson S., Lucena-Araujo, A.R., Bezerra, M.A., 2021. Influence of UGT1A1 promoter polymorphism, α -thalassemia and β s haplotype in bilirubin levels and cholelithiasis in a large sickle cell anemia cohort. *Ann Hematol* 100, 903–911. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04422-1>
- Beecher, G., Fleming, M.D., Liewluck, T., 2022. Hereditary myopathies associated with hematological abnormalities. *Muscle Nerve*. <https://doi.org/10.1002/mus.27474>

- Bennekou, P., 1988. Steady-state and transient membrane potentials in human red cells determined by protonophore-mediated pH changes. *J. Membr Biol.* 106, 41–46. <https://doi.org/10.1007/BF01871765>
- Bianchi, P., Fermo, E., 2020. Molecular heterogeneity of pyruvate kinase deficiency. *Haematologica* 105, 2218–2228. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.241141>
- Bianchi, P., Vercellati, C., Fermo, E., 2020. How will next generation sequencing (NGS) improve the diagnosis of congenital hemolytic anemia? *Ann Transl Med* 8, 268–268. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.02.151>
- Borges, P., Pasqualim, G., Matte, U., 2021. Which Is the Best In Silico Program for the Missense Variations in IDUA Gene? A Comparison of 33 Programs Plus a Conservation Score and Evaluation of 586 Missense Variants. *Front Mol Biosci* 8, 752797. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.752797>
- Bouhassira, E.E., Schwartz, R.S., Yawata, Y., Ata, K., Kanzaki, A., Qiu, J.J.-H., Nagel, R.L., Rybicki, A.C., 1992. An Alanine-to-Threonine Substitution in Protein 4.2 cDNA Is Associated With a Japanese Form of Hereditary Hemolytic Anemia (Protein 4.2NIPPON). *Blood* 79, 1846–1854. <https://doi.org/10.1182/blood.V79.7.1846.1846>
- Bris, C., Goudenege, D., Desquirit-Dumas, V., Charif, M., Colin, E., Bonneau, D., Amati-Bonneau, P., Lenaers, G., Reynier, P., Procaccio, V., 2018. Bioinformatics Tools and Databases to Assess the Pathogenicity of Mitochondrial DNA Variants in the Field of Next Generation Sequencing. *Front Genet* 9, 632. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00632>
- Brnich, S.E., Abou Tayoun, A.N., Couch, F.J., Cutting, G.R., Greenblatt, M.S., Heinen, C.D., Kanavy, D.M., Luo, X., McNulty, S.M., Starita, L.M., Tavtigian, S.V., Wright, M.W., Harrison, S.M., Biesecker, L.G., Berg, J.S., Abou Tayoun, A.N., Berg, J.S., Biesecker, L.G., Brenner, S.E., Cutting, G.R., Ellard, S., Greenblatt, M.S., Harrison, S.M., Karbassi, I., Karchin, R., Mester, J.L., O'Donnell-Luria, A., Pesaran, T., Plon, S.E., Rehm, H., Tavtigian, S.V., Topper, S., On behalf of the Clinical Genome Resource Sequence Variant Interpretation Working Group, 2019. Recommendations for application of the functional evidence PS3/BS3 criterion using the ACMG/AMP sequence variant interpretation framework. *Genome Medicine* 12, 3. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0690-2>
- Brodsky, R.A., 2014. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 124, 2804–2811. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-522128>
- Brown, D., 2017. The Discovery of Water Channels (Aquaporins). *Ann Nutr Metab* 70, 37–42. <https://doi.org/10.1159/000463061>
- Bruce, L.J., Guizouarn, H., Burton, N.M., Gabillat, N., Poole, J., Flatt, J.F., Brady, R.L., Borgese, F., Delaunay, J., Stewart, G.W., 2009. The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. *Blood* 113, 1350–1357. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-171140>
- Bruce, L.J., Robinson, H.C., Guizouarn, H., Borgese, F., Harrison, P., King, M.-J., Goede, J.S., Coles, S.E., Gore, D.M., Lutz, H.U., Ficarella, R., Layton, D.M., Iolascon, A., Ellory, J.C., Stewart, G.W., 2005. Monovalent cation leaks in human red cells caused by single amino-acid substitutions in the transport domain of the band 3 chloride-bicarbonate exchanger, AE1. *Nat Genet* 37, 1258–1263. <https://doi.org/10.1038/ng1656>
- BRUCE, L.J., WRONG, O., TOYE, A.M., YOUNG, M.T., OGLE, G., ISMAIL, Z., SINHA, A.K., MCMASTER, P., HWAHWANJE, I., NASH, G.B., HART, S., LAVU, E., PALMER, R., OTHMAN, A., UNWIN,

- R.J., TANNER, M.J.A., 2000. Band 3 mutations, renal tubular acidosis and South-East Asian ovalocytosis in Malaysia and Papua New Guinea : loss of up to 95 % band 3 transport in red cells 11.
- Brugnara, C., Gee, B., Armsby, C.C., Kurth, S., Sakamoto, M., Rifai, N., Alper, S.L., Platt, O.S., 1996. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J. Clin. Invest.* 97, 1227–1234. <https://doi.org/10.1172/JCI118537>
- Cahalan, S.M., Lukacs, V., Ranade, S.S., Chien, S., Bandell, M., Patapoutian, A., 2015. Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07370>
- Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Fernandez-Falgueras, A., Coll, M., Iglesias, A., Ferrer-Costa, C., Cesar, S., Arbelo, E., García-Álvarez, A., Jordà, P., Toro, R., Tiron de Llano, C., Grassi, S., Oliva, A., Brugada, J., Brugada, R., 2020. Reanalysis and reclassification of rare genetic variants associated with inherited arrhythmogenic syndromes. *EBioMedicine* 54. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102732>
- Cantú, I., Philipsen, S., 2014. Flicking the switch: adult hemoglobin expression in erythroid cells derived from cord blood and human induced pluripotent stem cells. *Haematologica* 99, 1647–1649. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.116483>
- Carayon, K., Chaoui, K., Ronzier, E., Lazar, I., Bertrand-Michel, J., Roques, V., Balor, S., Terce, F., Lopez, A., Salomé, L., Joly, E., 2011. Proteolipidic Composition of Exosomes Changes during Reticulocyte Maturation. *J. Biol. Chem.* 286, 34426–34439. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257444>
- Caulier, A., Jankovsky, N., Demont, Y., Ouled-Haddou, H., Demagny, J., Guitton, C., Merlusca, L., Lebon, D., Vong, P., Aubry, A., Lahary, A., Rose, C., Gréaume, S., Cardon, E., Platon, J., Ouadid-Ahidouch, H., Rochette, J., Marolleau, J.-P., Picard, V., Garçon, L., 2020. PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells. *Haematologica* 105, 610–622. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.218503>
- Caulier, A., Rapetti-Mauss, R., Guizouarn, H., Picard, V., Garçon, L., Badens, C., 2018. Primary red cell hydration disorders: Pathogenesis and diagnosis. *International Journal of Laboratory Hematology* 40, 68–73. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12820>
- Chen, M., Ye, Y.-P., Liao, L., Deng, X.-L., Qiu, Y.-L., Lin, F.-Q., 2020. Hereditary spherocytosis overlooked for 7 years in a pediatric patient with β -thalassemia trait and novel compound heterozygous mutations of SPTA1 gene. *Hematology* 25, 438–445. <https://doi.org/10.1080/16078454.2020.1846874>
- Cheuque, C., Querales, M., León, R., Salas, R., Torres, R., 2022. An Efficient Multi-Level Convolutional Neural Network Approach for White Blood Cells Classification. *Diagnostics (Basel)* 12, 248. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020248>
- Choi, E.-J., Cho, Y.-U., Hur, E.-H., Jang, S., Kim, N., Park, H.-S., Lee, Jung-Hee, Lee, K.-H., Kim, S.-H., Hwang, S.-H., Seo, E.-J., Park, C.-J., Lee, Je-Hwan, 2021. Unique ethnic features of *DDX41* mutations in patients with idiopathic cytopenia of undetermined significance, myelodysplastic syndrome, or acute myeloid leukemia. *haematol.* <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.270553>
- Chonat, S., Risinger, M., Sakthivel, H., Niss, O., Rothman, J.A., Hsieh, L., Chou, S.T., Kwiatkowski, J.L., Khandros, E., Gorman, M.F., Wells, D.T., Maghathe, T., Dagaonkar, N., Seu, K.G.,

- Zhang, K., Zhang, W., Kalfa, T.A., 2019. The Spectrum of SPTA1-Associated Hereditary Spherocytosis. *Front. Physiol.* 10, 815. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00815>
- Clark, M.R., Mohandas, N., Embury, S.H., Lubin, B.H., 1982. A Simple Laboratory Alternative to Irreversibly Sickled Cell (ISC) Counts. *Blood* 60, 659–662. <https://doi.org/10.1182/blood.V60.3.659.659>
- Clark, M.R., Mohandas, N., Shohet, S.B., 1983. Osmotic Gradient Ektacytometry: Comprehensive Characterization of Red Cell Volume and Surface Maintenance. *Blood* 61, 899–910. <https://doi.org/10.1182/blood.V61.5.899.899>
- Clift, K., Macklin, S., Halverson, C., McCormick, J.B., Abu Dabrh, A.M., Hines, S., 2020. Patients' views on variants of uncertain significance across indications. *J Community Genet* 11, 139–145. <https://doi.org/10.1007/s12687-019-00434-7>
- Corrons, J.L.V., Casafont, L.B., Frasnado, E.F., 2021. Concise review: how do red blood cells born, live, and die? *Ann Hematol* 100, 2425–2433. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04575-z>
- Corry, W.D., Bresnahan, P.A., Seaman, G.V., 1982. Evaluation of density gradient separation methods. *J Biochem Biophys Methods* 7, 71–82. [https://doi.org/10.1016/0165-022x\(82\)90038-0](https://doi.org/10.1016/0165-022x(82)90038-0)
- Crary, S.E., Buchanan, G.R., 2009. Vascular complications after splenectomy for hematologic disorders. *Blood* 114, 2861–2868. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-210112>
- Cutting, G.R., 2014. Annotating DNA variants is the next major goal for human genetics. *Am J Hum Genet* 94, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.12.008>
- Da Costa, L., Suner, L., Galimand, J., Bonnel, A., Pascreau, T., Couque, N., Fenneteau, O., Mohandas, N., Society of Hematology and Pediatric Immunology (SHIP) group, French Society of Hematology (SFH), 2016a. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells Mol. Dis.* 56, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2015.09.001>
- Da Costa, L., Suner, L., Galimand, J., Bonnel, A., Pascreau, T., Couque, N., Fenneteau, O., Mohandas, N., Society of Hematology and Pediatric Immunology (SHIP) group, French Society of Hematology (SFH), 2016b. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells Mol. Dis.* 56, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2015.09.001>
- Da Kuang, null, Weile, J., Kishore, N., Rubin, A.F., Fields, S., Fowler, D.M., Roth, F.P., 2021. MaveRegistry: a collaboration platform for multiplexed assays of variant effect. *Bioinformatics* btab215. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab215>
- Danielczok, J.G., Terriac, E., Hertz, L., Petkova-Kirova, P., Lautenschläger, F., Laschke, M.W., Kaestner, L., 2017. Red Blood Cell Passage of Small Capillaries Is Associated with Transient Ca²⁺-mediated Adaptations. *Front Physiol* 8, 979. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00979>
- Danise, P., Amendola, G., Nobili, B., Perrotta, S., Miraglia Del Giudice, E., Matarese, S. m. r., Iolascon, A., Brugnara, C., 2001. Flow-cytometric analysis of erythrocytes and reticulocytes in congenital dyserythropoietic anaemia type II (CDA II): value in differential diagnosis with hereditary spherocytosis. *Clinical & Laboratory Haematology* 23, 7–13. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.2001.00354.x>

- Danon, D., Marikovsky, V., 1964. DETERMINATION OF DENSITY DISTRIBUTION OF RED CELL POPULATION. *J. Lab. Clin. Med.* 64, 668–674.
- de Back, D., Kostova, E., van Kraaij, M., van den Berg, T., Van Bruggen, R., 2014. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Frontiers in Physiology* 5.
- DeZern, A.E., Malcovati, L., Ebert, B.L., 2019. CHIP, CCUS, and Other Acronyms: Definition, Implications, and Impact on Practice. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 400–410. https://doi.org/10.1200/EDBK_239083
- Dongerdiye, R., Jagadeesh, S., Suresh, B., Rajendran, A., Devendra, R., Warang, P., Kedar, P.S., 2021a. Novel pathogenic variant c.2714C>A (p. Thr905Lys) in the HK1 gene causing severe haemolytic anaemia with developmental delay in an Indian family. *J Clin Pathol* 74, 620–624. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206960>
- Dongerdiye, R., Sampagar, A., Devendra, R., Warang, P., Kedar, P., 2021b. Rare hereditary nonspherocytic hemolytic anemia caused by a novel homozygous mutation, c.301C>A, (Q101K), in the AK1 gene in an Indian family. *BMC Med Genomics* 14, 191. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-01038-2>
- Doudna, J.A., Charpentier, E., 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Edelman, E.J., Maksimova, Y., Duru, F., Altay, C., Gallagher, P.G., 2007. A complex splicing defect associated with homozygous ankyrin-deficient hereditary spherocytosis. *Blood* 109, 5491–5493. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-046573>
- Faivre, M., Renoux, C., Bessaa, A., Da Costa, L., Joly, P., Gauthier, A., Connes, P., 2020. Mechanical Signature of Red Blood Cells Flowing Out of a Microfluidic Constriction Is Impacted by Membrane Elasticity, Cell Surface-to-Volume Ratio and Diseases. *Front. Physiol.* 11, 576. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00576>
- Fasola, F.A., Fowodu, F.O., Shokunbi, W.A., Kotila, T.R., 2019. The effect of the coinheritance of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the severity of sickle cell disease. *Niger Postgrad Med J* 26, 118–122. https://doi.org/10.4103/npmj.npmj_29_19
- Favalli, V., Tini, G., Bonetti, E., Voza, G., Guida, A., Gandini, S., Pelicci, P.G., Mazzarella, L., 2021. Machine learning-based reclassification of germline variants of unknown significance: The RENOVO algorithm. *Am J Hum Genet* 108, 682–695. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.03.010>
- Fayer, S., Horton, C., Dines, J.N., Rubin, A.F., Richardson, M.E., McGoldrick, K., Hernandez, F., Pesaran, T., Karam, R., Shirts, B.H., Fowler, D.M., Starita, L.M., 2021. Closing the gap: Systematic integration of multiplexed functional data resolves variants of uncertain significance in BRCA1, TP53, and PTEN. *Am J Hum Genet* 108, 2248–2258. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.11.001>
- Fermo, E., Bogdanova, A., Petkova-Kirova, P., Zaninoni, A., Marcello, A.P., Makhro, A., Hänggi, P., Hertz, L., Danielczok, J., Vercellati, C., Mirra, N., Zanella, A., Cortelezzi, A., Barcellini, W., Kaestner, L., Bianchi, P., 2017. ‘Gardos Channelopathy’: a variant of hereditary Stomatocytosis with complex molecular regulation. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01591-w>
- Fermo, E., Vercellati, C., Marcello, A.P., Keskin, E.Y., Perrotta, S., Zaninoni, A., Brancaleoni, V., Zanella, A., Giannotta, J.A., Barcellini, W., Bianchi, P., 2021. Targeted Next Generation Sequencing and Diagnosis of Congenital Hemolytic Anemias: A Three Years Experience

- Monocentric Study. *Front Physiol* 12, 684569. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.684569>
- Fernández-Marmiesse, A., Gouveia, S., Couce, M.L., 2018. NGS Technologies as a Turning Point in Rare Disease Research, Diagnosis and Treatment. *Curr Med Chem* 25, 404–432. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170718101946>
- Fibach, E., Manor, D., Treves, A., Rachmilewitz, E.A., 1991. Growth of human normal erythroid progenitors in liquid culture: A comparison with colony growth in semisolid culture. *The International Journal of Cell Cloning* 9, 57–64. <https://doi.org/10.1002/stem.5530090108>
- Filippone, C., Franssila, R., Kumar, A., Saikko, L., Kovanen, P.E., Söderlund-Venermo, M., Hedman, K., 2010. Erythroid Progenitor Cells Expanded from Peripheral Blood without Mobilization or Preselection: Molecular Characteristics and Functional Competence. *PLoS ONE* 5, e9496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009496>
- Filser, M., Giansily-Blaizot, M., Grenier, M., Monedero Alonso, D., Bouyer, G., Peres, L., Egée, S., Aral, B., Airaud, F., Da Costa, L.M., Picard, V., Cougoul, P., Palach, M., Bezieau, S., Garrec, C., Aguilar Martinez, P., Gardie, B., Girodon, F., 2020. Increased incidence of germline PIEZO1 mutations in individuals with idiopathic erythrocytosis. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008424>
- Finsterer, J., Frank, M., 2015. Haematological abnormalities in mitochondrial disorders. *Singapore Med J* 56, 412–419. <https://doi.org/10.11622/smedj.2015112>
- Flatt, J.F., Bruce, L.J., 2018. The Molecular Basis for Altered Cation Permeability in Hereditary Stomatocytic Human Red Blood Cells. *Front. Physiol.* 9, 367. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00367>
- Fortugno, C., Galea, E., Cantaffa, R., Gigliotti, F., Fabiano, R.L., Talarico, V., Raiola, G., Galati, M.C., 2021. Hereditary red blood cell membrane defects. Detection of PIEZO1 mutations associated with SPTA1 mutations. An unusual clinical case of hereditary xerocytosis. *Pediatr Hematol Oncol* 38, 184–190. <https://doi.org/10.1080/08880018.2020.1829219>
- Fowler, D.M., Araya, C.L., Fleishman, S.J., Kellogg, E.H., Stephany, J.J., Baker, D., Fields, S., 2010. High-resolution mapping of protein sequence-function relationships. *Nat Methods* 7, 741–746. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1492>
- Fraiman, Y.S., Moliterno, A.R., 2015. High-density genomic analysis reveals basis of spherocytosis in myelodysplastic syndrome. *Blood* 125, 3517–3517. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-617142>
- Frazer, J., Notin, P., Dias, M., Gomez, A., Min, J.K., Brock, K., Gal, Y., Marks, D.S., 2021. Disease variant prediction with deep generative models of evolutionary data. *Nature* 599, 91–95. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04043-8>
- Frederiksen, H., 2019. Dehydrated hereditary stomatocytosis: clinical perspectives. *J Blood Med* 10, 183–191. <https://doi.org/10.2147/JBM.S179764>
- Frimat, M., Boudhabhay, I., Roumenina, L.T., 2019. Hemolysis Derived Products Toxicity and Endothelium: Model of the Second Hit. *Toxins (Basel)* 11, 660. <https://doi.org/10.3390/toxins11110660>
- Fuster-García, C., García-Bohórquez, B., Rodríguez-Muñoz, A., Millán, J.M., García-García, G., 2020. Application of CRISPR Tools for Variant Interpretation and Disease Modeling in Inherited Retinal Dystrophies. *Genes (Basel)* 11, E473. <https://doi.org/10.3390/genes11050473>

- Gallagher, P.G., 2017. Disorders of erythrocyte hydration. *Blood* 130, 2699–2708. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-590810>
- Gallagher, P.G., Maksimova, Y., Lezon-Geyda, K., Newburger, P.E., Medeiros, D., Hanson, R.D., Rothman, J., Israels, S., Wall, D.A., Jr, R.F.S., Sieff, C., Gowans, L.K., Mittal, N., Rivera-Santiago, R., Speicher, D.W., Baserga, S.J., Schulz, V.P., 2019. Aberrant splicing contributes to severe α -spectrin–linked congenital hemolytic anemia [WWW Document]. <https://doi.org/10.1172/JCI127195>
- Gardos, G., 1958. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 30, 653–654. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(58\)90124-0](https://doi.org/10.1016/0006-3002(58)90124-0)
- Gardos, G., 1956. The permeability of human erythrocytes to potassium. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 10, 185–189.
- Gasperini, M., Starita, L., Shendure, J., 2016. The power of multiplexed functional analysis of genetic variants. *Nat Protoc* 11, 1782–1787. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.135>
- Gautier, E.-F., Leduc, M., Cochet, S., Bailly, K., Lacombe, C., Mohandas, N., Guillonnet, F., El Nemer, W., Mayeux, P., 2018. Absolute proteome quantification of highly purified populations of circulating reticulocytes and mature erythrocytes. *Blood Advances* 2, 2646–2657. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018023515>
- Gelman, H., Dines, J.N., Berg, J., Berger, A.H., Brnich, S., Hisama, F.M., James, R.G., Rubin, A.F., Shendure, J., Shirts, B., Fowler, D.M., Starita, L.M., 2019. Recommendations for the collection and use of multiplexed functional data for clinical variant interpretation. *Genome Med* 11. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0698-7>
- Gholizad-Kolveiri, S., Hooman, N., Alizadeh, R., Hoseini, R., Otukesh, H., Talebi, S., Akouchekian, M., 2020. Whole exome sequencing revealed a novel homozygous variant in the DGKE catalytic domain: a case report of familial hemolytic uremic syndrome. *BMC Med Genet* 21, 169. <https://doi.org/10.1186/s12881-020-01097-9>
- Girodon, F., Garçon, L., Bergoin, E., Largier, M., Delaunay, J., Fénéant-Thibault, M., Maynadié, M., Couillaud, G., Moreira, S., Cynober, T., 2008. Usefulness of the eosin-5'-maleimide cytometric method as a first-line screening test for the diagnosis of hereditary spherocytosis: comparison with ektacytometry and protein electrophoresis. *British Journal of Haematology* 140, 468–470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06944.x>
- Glogowska, E., Lezon-Geyda, K., Maksimova, Y., Schulz, V.P., Gallagher, P.G., 2015. Mutations in the Gardos channel (KCNN4) are associated with hereditary xerocytosis. *Blood* 126, 1281–1284. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-657957>
- Gokhin, D.S., Nowak, R.B., Khoory, J.A., Piedra, A. de la, Ghiran, I.C., Fowler, V.M., 2015. Dynamic actin filaments control the mechanical behavior of the human red blood cell membrane. *MBoC* 26, 1699–1710. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-12-1583>
- Goreke, U., Bode, A., Yaman, S., Gurkan, U.A., Durmus, N.G., 2022. Size and density measurements of single sickle red blood cells using microfluidic magnetic levitation. *Lab Chip* 22, 683–696. <https://doi.org/10.1039/d1lc00686j>
- Guo, H., Liu, L., Nishiga, M., Cong, L., Wu, J.C., 2021. Deciphering pathogenicity of variants of uncertain significance with CRISPR-edited iPSCs. *Trends Genet* 37, 1109–1123. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.08.009>

- Guo, J., Gu, D., Zhao, T., Zhao, Z., Xiong, Y., Sun, M., Xin, C., Zhang, Y., Pei, L., Sun, J., 2021. Trends in Piezo Channel Research Over the Past Decade: A Bibliometric Analysis. *Front. Pharmacol.* 12, 668714. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.668714>
- Hage-Sleiman, M., Zhu, J., Guérineau, H., Ronez, E., Jondeau, K., Kosmider, O., Picard, V., Denguir, M., Maillon, A., Clauser, S., Bardet, V., 2021. Reticulocytosis As a Whistleblower: A Rare Case of Acquired Elliptocytosis in a Myelodysplastic Syndrome Patient With Trisomy 8. *Hemasphere* 5, e517. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000517>
- Himmelreich, N., Shen, N., Okun, J.G., Thiel, C., Hoffmann, G.F., Blau, N., 2018. Relationship between genotype, phenylalanine hydroxylase expression and in vitro activity and metabolic phenotype in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 125, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.06.011>
- Hoffman, J.F., Joiner, W., Nehrke, K., Potapova, O., Foye, K., Wickrema, A., 2003. The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca²⁺-activated K⁺ channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 7366–7371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1232342100>
- Hong, M., He, G., 2017. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myelodysplastic Syndromes. *J Transl Int Med* 5, 139–143. <https://doi.org/10.1515/jtim-2017-0002>
- Huisjes, R., Bogdanova, A., van Solinge, W.W., Schiffelers, R.M., Kaestner, L., van Wijk, R., 2018. Squeezing for Life – Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front Physiol* 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00656>
- Ilboudo, Y., Bartolucci, P., Rivera, A., Sedzro, J.-C., Beaudoin, M., Trudel, M., Alper, S.L., Brugnara, C., Galactéros, F., Lettre, G., 2017. Genome-wide association study of erythrocyte density in sickle cell disease patients. *Blood Cells Mol Dis* 65, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.05.005>
- Iolascon, A., Andolfo, I., Barcellini, W., Corcione, F., Garçon, L., De Franceschi, L., Pignata, C., Graziadei, G., Pospisilova, D., Rees, D.C., de Montalembert, M., Rivella, S., Gambale, A., Russo, R., Ribeiro, L., Vives-Corrons, J., Martinez, P.A., Kattamis, A., Gulbis, B., Cappellini, M.D., Roberts, I., Tamary, H., 2017. Recommendations regarding splenectomy in hereditary hemolytic anemias. *Haematologica* 102, 1304–1313. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.161166>
- Iolascon, A., Andolfo, I., Russo, R., 2020. Congenital dyserythropoietic anemias. *Blood* 136, 1274–1283. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000948>
- Iolascon, A., Andolfo, I., Russo, R., 2019. Advances in understanding the pathogenesis of red cell membrane disorders. *British Journal of Haematology* 187, 13–24. <https://doi.org/10.1111/bjh.16126>
- Iolascon, A., Andolfo, I., Russo, R., n.d. Congenital dyserythropoietic anemias 10.
- Jamwal, M., Aggarwal, A., Palodhi, A., Sharma, P., Bansal, D., Trehan, A., Malhotra, P., Maitra, A., Das, R., 2020. Next-Generation Sequencing-Based Diagnosis of Unexplained Inherited Hemolytic Anemias Reveals Wide Genetic and Phenotypic Heterogeneity. *J Mol Diagn* 22, 579–590. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.01.007>
- Jamwal, M., Aggarwal, A., Palodi, A., Sharma, P., Bansal, D., Maitra, A., Das, R., 2019. A nonsense variant in the Hexokinase 1 gene (HK1) causing severe non-spherocytic haemolytic

- anaemia: genetic analysis exemplifies ambiguity due to multiple Isoforms. *British Journal of Haematology* 186, e142–e145. <https://doi.org/10.1111/bjh.15981>
- Jani, Vivek P., Lucas, A., Jani, Vinay P., Munoz, C., Williams, A.T., Ortiz, D., Yalcin, O., Cabrales, P., 2020. Numerical Model for the Determination of Erythrocyte Mechanical Properties and Wall Shear Stress in vivo From Intravital Microscopy. *Frontiers in Physiology* 10.
- Jankovsky, N., Caulier, A., Demagny, J., Guitton, C., Djordjevic, S., Lebon, D., Ouled-Haddou, H., Picard, V., Garçon, L., 2021. Recent advances in the pathophysiology of PIEZO1-related hereditary xerocytosis. *American Journal of Hematology* 96, 1017–1026. <https://doi.org/10.1002/ajh.26192>
- Jansen, J., Qiao, M., Hertz, L., Wang, X., Fermo, E., Zaninoni, A., Colombatti, R., Bernhardt, I., Bianchi, P., Kaestner, L., 2021. Mechanistic ion channel interactions in red cells of patients with Gárdos channelopathy. *Blood Advances* 5, 3303–3308. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003823>
- Jennings, M.L., 2021. Cell physiology and molecular mechanism of anion transport by erythrocyte band 3/AE1. *Am J Physiol Cell Physiol* 321, C1028–C1059. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00275.2021>
- Jha, S.K., Vaqar, S., 2022. Hereditary Elliptocytosis, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Jia, X., Burugula, B.B., Chen, V., Lemons, R.M., Jayakody, S., Maksutova, M., Kitzman, J.O., 2021. Massively parallel functional testing of MSH2 missense variants conferring Lynch syndrome risk. *Am J Hum Genet* 108, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.12.003>
- Kaestner, L., Bianchi, P., 2020. Trends in the Development of Diagnostic Tools for Red Blood Cell-Related Diseases and Anemias. *Front Physiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00387>
- Kaestner, L., Bogdanova, A., Egee, S., 2020. Calcium Channels and Calcium-Regulated Channels in Human Red Blood Cells. *Adv Exp Med Biol* 1131, 625–648. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_25
- Kalayinia, S., Goodarzynejad, H., Maleki, M., Mahdieh, N., 2018. Next generation sequencing applications for cardiovascular disease. *Annals of Medicine* 50, 91–109. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1392595>
- Kalfa, T.A., 2021. Diagnosis and clinical management of red cell membrane disorders. *Hematology* 2021, 331–340. <https://doi.org/10.1182/hematology.2021000265>
- Kanavy, D.M., McNulty, S.M., Jairath, M.K., Brnich, S.E., Bizon, C., Powell, B.C., Berg, J.S., 2019. Comparative analysis of functional assay evidence use by ClinGen Variant Curation Expert Panels. *Genome Med* 11, 77. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0683-1>
- Kedar, P.S., Gupta, V., Dongerdiye, R., Chiddarwar, A., Warang, P., Madkaikar, M.R., 2018. Molecular diagnosis of unexplained haemolytic anaemia using targeted next-generation sequencing panel revealed (p.Ala337Thr) novel mutation in GPI gene in two Indian patients. *Journal of Clinical Pathology* *jclinpath-2018-205420*. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2018-205420>
- Khan, P.N., Nair, R.J., Olivares, J., Tingle, L.E., Li, Z., 2009. Postsplenectomy reactive thrombocytosis. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 22, 9–12.

- Kim, Y., Park, J., Kim, M., 2017. Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era. *Blood Research* 52, 84. <https://doi.org/10.5045/br.2017.52.2.84>
- King, M.-J., Garçon, L., Hoyer, J.D., Iolascon, A., Picard, V., Stewart, G., Bianchi, P., Lee, S.-H., Zanella, A., 2015. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *International Journal of Laboratory Hematology* 37, 304–325. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12335>
- Klei, T.R.L., Dalimot, J.J., Beuger, B.M., Veldthuis, M., Ichou, F.A., Verkuijlen, P.J.J.H., Seignette, I.M., Ligthart, P.C., Kuijpers, T.W., van Zwieten, R., van Bruggen, R., 2020. The Gardos effect drives erythrocyte senescence and leads to Lu/BCAM and CD44 adhesion molecule activation. *Blood Advances* 4, 6218–6229. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003077>
- Kourula, S., Wong, R., Vreman, H., Stevenson, D., 2012. Metalloporphyrins – An Update. *Frontiers in pharmacology* 3, 68. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00068>
- Krishnevskaia, E., Rizzuto, V., Payán-Pernía, S., Remacha, Á., Torrent, M., Ruiz, A., Badell, I., Vives Corrons, J.-L., 2020. Coinheritance of hereditary ellyptocytosis, pyruvate kinase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations. A rare anemia diagnostic paradigm. *Int J Lab Hematol* 42, e55–e58. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13110>
- Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T.C.S., Kramer, C.M., Lückstädt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B.E., Kelm, M., Cortese-Krott, M.M., 2017. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxid Redox Signal* 26, 718–742. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6954>
- Kurosaki, T., Maquat, L.E., 2016. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J Cell Sci* 129, 461–467. <https://doi.org/10.1242/jcs.181008>
- Leal, J.K.F., Adjobo-Hermans, M.J.W., Bosman, G.J.C.G.M., 2018. Red Blood Cell Homeostasis: Mechanisms and Effects of Microvesicle Generation in Health and Disease. *Front Physiol* 9, 703. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00703>
- Lee, S.Y., Chen, C.M.E., Lim, E.Y.P., Shen, L., Sathe, A., Singh, A., Sauer, J., Taghipour, K., Yip, C.Y.C., 2021. Image Analysis Using Machine Learning for Automated Detection of Hemoglobin H Inclusions in Blood Smears - A Method for Morphologic Detection of Rare Cells. *J Pathol Inform* 12, 18. https://doi.org/10.4103/jpi.jpi_110_20
- Lew, V.L., Bookchin, R.M., 2005. Ion Transport Pathology in the Mechanism of Sickle Cell Dehydration. *Physiological Reviews* 85, 179–200. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2003>
- Lew, V.L., Tiffert, T., 2017. On the Mechanism of Human Red Blood Cell Longevity: Roles of Calcium, the Sodium Pump, PIEZO1, and Gardos Channels. *Front Physiol* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00977>
- Li, H., Lykotrafitis, G., 2014. Erythrocyte Membrane Model with Explicit Description of the Lipid Bilayer and the Spectrin Network. *Biophys J* 107, 642–653. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.031>
- Lin, H., McBride, K.L., Garg, V., Zhao, M.-T., 2021. Decoding Genetics of Congenital Heart Disease Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *Front Cell Dev Biol* 9, 630069. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.630069>

- Liu, Y., Mei, Y., Han, X., Korobova, F.V., Prado, M.A., Yang, J., Peng, Z., Paulo, J.A., Gygi, S.P., Finley, D., Ji, P., 2021. Membrane skeleton modulates erythroid proteome remodeling and organelle clearance. *Blood* 137, 398–409. <https://doi.org/10.1182/blood.2020006673>
- Loman, N.J., Constantinidou, C., Chan, J.Z.M., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C.W., Robinson, E.R., Pallen, M.J., 2012. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat Rev Microbiol* 10, 599–606. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2850>
- Lovato, D.V., Herai, R.R., Pignatari, G.C., Beltrão-Braga, P.C.B., 2019. The Relevance of Variants With Unknown Significance for Autism Spectrum Disorder Considering the Genotype-Phenotype Interrelationship. *Front Psychiatry* 10, 409. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00409>
- Lunati, A., Petit, A., Lapillonne, H., Gameiro, C., Saillour, V., Garel, C., Doummar, D., Qebibo, L., Aissat, A., Fanen, P., Bartolucci, P., Galactéros, F., Funalot, B., Burglen, L., Mansour-Hendili, L., 2021. VPS4A mutation in syndromic congenital hemolytic anemia without obvious signs of dyserythropoiesis. *American Journal of Hematology* 96, E121–E123. <https://doi.org/10.1002/ajh.26099>
- Lux, S.E., 2016. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood* 127, 187–199. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-512772>
- Luzzatto, L., Ally, M., Notaro, R., 2020. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* 136, 1225–1240. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000944>
- Ma, S., Cahalan, S., LaMonte, G., Grubaugh, N.D., Zeng, W., Murthy, S.E., Paytas, E., Gamini, R., Lukacs, V., Whitwam, T., Loud, M., Lohia, R., Berry, L., Khan, S.M., Janse, C.J., Bandell, M., Schmedt, C., Wengelnik, K., Su, A.I., Honore, E., Winzeler, E.A., Andersen, K.G., Patapoutian, A., 2018. Common PIEZO1 Allele in African Populations Causes RBC Dehydration and Attenuates Plasmodium Infection. *Cell* 173, 443–455.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.047>
- Ma, S., Dubin, A.E., Zhang, Y., Mousavi, S.A.R., Wang, Y., Coombs, A.M., Loud, M., Andolfo, I., Patapoutian, A., 2021. A role of PIEZO1 in iron metabolism in mice and humans. *Cell* 184, 969–982.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.024>
- Macey, R.I., Adorante, J.S., Orme, F.W., 1978. Erythrocyte membrane potentials determined by hydrogen ion distribution. *Biochim. Biophys. Acta* 512, 284–295. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(78\)90253-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90253-5)
- Maher, A.D., Kuchel, P.W., 2003. The Gárdos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1182–1197. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00310-2](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00310-2)
- Malte, H., Lykkeboe, G., 2018. The Bohr/Haldane effect: a model-based uncovering of the full extent of its impact on O₂ delivery to and CO₂ removal from tissues. *J Appl Physiol* (1985) 125, 916–922. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00140.2018>
- Man, Y., Maji, D., An, R., Ahuja, S.P., Little, J.A., Suster, M.A., Mohseni, P., Gurkan, U.A., 2021. Microfluidic electrical impedance assessment of red blood cell-mediated microvascular occlusion. *Lab Chip* 21, 1036–1048. <https://doi.org/10.1039/d0lc01133a>
- Manabe, M., Hagiwara, Y., Asada, R., Tanizawa, N., Nanno, S., Koh, K.-R., 2021. Acquired elliptocytosis in a patient with myelodysplastic syndrome harbouring a novel unbalanced

- whole-arm translocation, der(14;20)(q10;p10). *Br J Haematol.* <https://doi.org/10.1111/bjh.17683>
- Mansour-Hendili, L., Aissat, A., Badaoui, B., Sakka, M., Gameiro, C., Ortonne, V., Wagner-Ballon, O., Pissard, S., Picard, V., Ghazal, K., Bahuau, M., Guitton, C., Mansour, Z., Duplan, M., Petit, A., Costedoat-Chalumeau, N., Michel, M., Bartolucci, P., Moutereau, S., Funalot, B., Galactéros, F., 2020. Exome sequencing for diagnosis of congenital hemolytic anemia. *Orphanet J Rare Dis* 15, 180. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01425-5>
- Mansour-Hendili, L., Egée, S., Monedero-Alonso, D., Bouyer, G., Godeau, B., Badaoui, B., Lunati, A., Noizat, C., Aissat, A., Kiger, L., Mekki, C., Picard, V., Moutereau, S., Fanen, P., Bartolucci, P., Garçon, L., Galactéros, F., Funalot, B., 2021. Multiple thrombosis in a patient with Gardos channelopathy and a new KCNN4 mutation. *Am J Hematol.* <https://doi.org/10.1002/ajh.26245>
- Mansour-Hendili, L., Flamarion, E., Michel, M., Morbieu, C., Gameiro, C., Sloma, I., Badaoui, B., Darnige, L., Camard, M., Lunati-Rozie, A., Aissat, A., Tarfi, S., Friedrich, C., Picard, V., Garçon, L., Abermil, N., Kaltenbach, S., Radford-Weiss, I., Kosmider, O., Fanen, P., Bartolucci, P., Godeau, B., Galactéros, F., Funalot, B., n.d. Acquired spherocytosis due to somatic ANK1 mutations as a manifestation of clonal hematopoiesis in elderly patients. *American Journal of Hematology* n/a. <https://doi.org/10.1002/ajh.26593>
- Mckean, N.E., Handley, R.R., Snell, R.G., 2021. A Review of the Current Mammalian Models of Alzheimer's Disease and Challenges That Need to Be Overcome. *Int J Mol Sci* 22, 13168. <https://doi.org/10.3390/ijms222313168>
- McMahon, T.J., Darrow, C.C., Hoehn, B.A., Zhu, H., 2021. Generation and Export of Red Blood Cell ATP in Health and Disease. *Frontiers in Physiology* 12.
- Meglic, A., Debeljak, M., Kovac, J., Trampus Bakija, A., Rajic, V., Kojc, N., Trebusak Podkrajsek, K., 2020. SPTB related spherocytosis in a three-generation family presenting with kidney failure in adulthood due to co-occurrence of UMOD disease causing variant. *Nefrologia (Engl Ed)* 40, 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2019.10.009>
- Mei, Y., Liu, Y., Ji, P., 2020. Understanding terminal erythropoiesis: An update on chromatin condensation, enucleation, and reticulocyte maturation. *Blood Reviews* 100740. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100740>
- Michalak, S.S., Olewicz-Gawlik, A., Rupa-Matysek, J., Wolny-Rokicka, E., Nowakowska, E., Gil, L., 2020. Autoimmune hemolytic anemia: current knowledge and perspectives. *Immun Ageing* 17, 38. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-00208-7>
- Min, J.-Y., Park, S.-J., Kang, E.-J., Hwang, S.-Y., Han, S.-H., 2022. Mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in 157 Korean CADASIL patients: a multicenter study. *Neurogenetics* 23, 45–58. <https://doi.org/10.1007/s10048-021-00674-1>
- Minucci, A., Ruggiero, A., Canu, G., Maurizi, P., De Bonis, M., Concolino, P., De Luca, D., Capoluongo, E., 2015. Co-inheritance of G6PD and PK deficiencies in a neonate carrying a Novel UGT1A1 genotype associated to Crigler-Najjar type II syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 62, 1680–1681. <https://doi.org/10.1002/pbc.25500>
- Mohandas, N., 2018. Inherited hemolytic anemia: a possessive beginner's guide. *Hematology* 2018, 377–381. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2018.1.377>
- Mohandas, N., Clark, M.R., Jacobs, M.S., Shohet, S.B., 1980. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *J Clin Invest* 66, 563–573.

- Mohandas, N., Gallagher, P.G., 2008. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 112, 3939–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
- Molina, A., Rodellar, J., Boldú, L., Acevedo, A., Alférez, S., Merino, A., 2021. Automatic identification of malaria and other red blood cell inclusions using convolutional neural networks. *Comput Biol Med* 136, 104680. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104680>
- Monedero Alonso, D., Pérès, L., Hatem, A., Bouyer, G., Egée, S., 2021. The Chloride Conductance Inhibitor NS3623 Enhances the Activity of a Non-selective Cation Channel in Hyperpolarizing Conditions. *Frontiers in Physiology* 12.
- Mullin, N.K., Voigt, A.P., Cooke, J.A., Bohrer, L.R., Burnight, E.R., Stone, E.M., Mullins, R.F., Tucker, B.A., 2021. Patient derived stem cells for discovery and validation of novel pathogenic variants in inherited retinal disease. *Prog Retin Eye Res* 83, 100918. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100918>
- Murphy, J.R., 1973. Influence of temperature and method of centrifugation on the separation of erythrocytes. *J Lab Clin Med* 82, 334–341.
- Muzzey, D., Evans, E.A., Lieber, C., 2015. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep* 3, 158–165. <https://doi.org/10.1007/s40142-015-0076-8>
- Nandakumar, S.K., Ulirsch, J.C., Sankaran, V.G., 2016. Advances in Understanding Erythropoiesis: Evolving Perspectives. *Br J Haematol* 173, 206–218. <https://doi.org/10.1111/bjh.13938>
- Narla, J., Mohandas, N., 2017. Red cell membrane disorders. *International Journal of Laboratory Hematology* 39, 47–52. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12657>
- Ng, P.C., Henikoff, S., 2001. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11, 863–874. <https://doi.org/10.1101/gr.176601>
- Nielsen, S.V., Hartmann-Petersen, R., Stein, A., Lindorff-Larsen, K., 2021. Multiplexed assays reveal effects of missense variants in MSH2 and cancer predisposition. *PLOS Genetics* 17, e1009496. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009496>
- Nigra, A.D., Casale, C.H., Santander, V.S., 2020. Human erythrocytes: cytoskeleton and its origin. *Cell Mol Life Sci* 77, 1681–1694. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03346-4>
- Niss, O., Chonat, S., Dagaonkar, N., Almansoori, M.O., Kerr, K., Rogers, Z.R., McGann, P.T., Quarmyne, M.-O., Risinger, M., Zhang, K., Kalfa, T.A., 2016. Genotype-phenotype correlations in hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 61, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2016.07.003>
- Niss, O., Lorschach, R.B., Berger, M., Chonat, S., McLemore, M., Buchbinder, D., McCavit, T., Shaffer, L.G., Simpson, J., Schwartz, J.H., Mezmarich, J., Emberesh, M., Seu, K.G., Zhang, W., Kalfa, T.A., CDAR consortium, 2021. Congenital dyserythropoietic anemia type I: First report from the Congenital Dyserythropoietic Anemia Registry of North America (CDAR). *Blood Cells Mol Dis* 87, 102534. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2020.102534>
- Nj, M., A, B., R, van K., E, C., J, P., Cc, B., M, W., Mj, K., R, K., Aw, P., R, S., A, V., Pw, C., B, N., K, K., Jm, C., Jw, H., 2016. Survival protein anoctamin-6 controls multiple platelet responses including phospholipid scrambling, swelling, and protein cleavage [WWW Document]. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1096/fj.15-280446>

- Noris, M., Bresin, E., Mele, C., Remuzzi, G., 1993. Genetic Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome, in: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Gripp, K.W., Mirzaa, G.M., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews*[®]. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Nykamp, K., Anderson, M., Powers, M., Garcia, J., Herrera, B., Ho, Y.-Y., Kobayashi, Y., Patil, N., Thusberg, J., Westbrook, M., The Invitae Clinical Genomics Group, Topper, S., 2017. Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG–AMP variant classification criteria. *Genetics in Medicine* 19, 1105–1117. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.37>
- Patrick, K.L., 2007. 454 Life Sciences: Illuminating the future of genome sequencing and personalized medicine. *Yale J Biol Med* 80, 191–194.
- Pecoraro, V., Mandrioli, J., Carone, C., Chiò, A., Traynor, B.J., Trenti, T., 2020. The NGS technology for the identification of genes associated with the ALS. A systematic review. *European Journal of Clinical Investigation* 50, e13228. <https://doi.org/10.1111/eci.13228>
- Petkova-Kirova, P., Hertz, L., Danielczok, J., Huisjes, R., Makhro, A., Bogdanova, A., Mañú-Pereira, M.D.M., Vives Corrons, J.-L., van Wijk, R., Kaestner, L., 2019. Red Blood Cell Membrane Conductance in Hereditary Haemolytic Anaemias. *Front Physiol* 10, 386. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00386>
- Petrosino, M., Novak, L., Pasquo, A., Chiaraluce, R., Turina, P., Capriotti, E., Consalvi, V., 2021. Analysis and Interpretation of the Impact of Missense Variants in Cancer. *Int J Mol Sci* 22, 5416. <https://doi.org/10.3390/ijms22115416>
- Picard, V., Guitton, C., Thuret, I., Rose, C., Bendelac, L., Ghazal, K., Aguilar-Martinez, P., Badens, C., Barro, C., Bénéteau, C., Berger, C., Cathébras, P., Deconinck, E., Delaunay, J., Durand, J.-M., Firah, N., Galactéros, F., Godeau, B., Jaïs, X., Jaureguiberry, J.-P. de, Stradic, C.L., Lifermann, F., Maffre, R., Morin, G., Perrin, J., Proulle, V., Ruivard, M., Toutain, F., Lahary, A., Garçon, L., 2019. Clinical and biological features in PIEZO1-hereditary xerocytosis and Gardos-channelopathy: A retrospective series of 126 patients. *Haematologica* 2018.205328. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.205328>
- Picard, V., Proust, A., Eveillard, M., Flatt, J.F., Couec, M.-L., Caillaux, G., Fénéant-Thibault, M., Finkelstein, A., Raphaël, M., Delaunay, J., Bruce, L.J., Pissard, S., Thomas, C., 2014. Homozygous Southeast Asian ovalocytosis is a severe dyserythropoietic anemia associated with distal renal tubular acidosis. *Blood* 123, 1963–1965. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-548149>
- Piel, F.B., Steinberg, M.H., Rees, D.C., 2017. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 376, 1561–1573. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1510865>
- Piety, N.Z., Stutz, J., Yilmaz, N., Xia, H., Yoshida, T., Shevkoplyas, S.S., 2021. Microfluidic capillary networks are more sensitive than ektacytometry to the decline of red blood cell deformability induced by storage. *Sci Rep* 11, 604. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79710-3>
- Pipis, M., Rossor, A.M., Laura, M., Reilly, M.M., 2019. Next-generation sequencing in Charcot–Marie–Tooth disease: opportunities and challenges. *Nat Rev Neurol* 15, 644–656. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0254-5>
- Prchal, J.T., Castleberry, R.P., Parmley, R.T., Crist, W.M., Malluh, A., 1982. Hereditary Pyropoikilocytosis and Elliptocytosis: Clinical, Laboratory, and Ultrastructural Features in Infants and Children. *Pediatr Res* 16, 484–489. <https://doi.org/10.1203/00006450-198206000-00017>

- Rab, M.A.E., van Oirschot, B.A., Bos, J., Kanne, C.K., Sheehan, V.A., van Beers, E.J., van Wijk, R., 2019. Characterization of Sickling During Controlled Automated Deoxygenation with Oxygen Gradient Ektacytometry. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/60213>
- Ranganathan Ganakammal, S., Alexov, E., 2020. An Ensemble Approach to Predict the Pathogenicity of Synonymous Variants. *Genes (Basel)* 11, 1102. <https://doi.org/10.3390/genes11091102>
- Rapetti-Mauss, R., Lacoste, C., Picard, V., Guitton, C., Lombard, E., Loosveld, M., Nivaggioni, V., Dasilva, N., Salgado, D., Desvignes, J.-P., Beroud, C., Viout, P., Bernard, M., Soriani, O., Vinti, H., Lacroze, V., Feneant-Thibault, M., Thuret, I., Guizouarn, H., Badens, C., 2015. A mutation in the Gardos channel is associated with hereditary xerocytosis. *Blood* 126, 1273–1280. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-642496>
- Rennie, C.M., Thompson, S., Parker, A.C., Maddy, A., 1979. Human erythrocyte fractionation in “percoll” density gradients. *Clinica Chimica Acta* 98, 119–125. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(79\)90172-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(79)90172-4)
- Riley, L.G., Heeney, M.M., Rudinger-Thirion, J., Frugier, M., Campagna, D.R., Zhou, R., Hale, G.A., Hilliard, L.M., Kaplan, J.A., Kwiatkowski, J.L., Sieff, C.A., Steensma, D.P., Rennings, A.J., Simons, A., Schaap, N., Roodenburg, R.J., Kleefstra, T., Arenillas, L., Fita-Torró, J., Ahmed, R., Abboud, M., Bechara, E., Farah, R., Tamminga, R.Y.J., Bottomley, S.S., Sanchez, M., Huls, G., Swinkels, D.W., Christodoulou, J., Fleming, M.D., 2018. The phenotypic spectrum of germline YARS2 variants: from isolated sideroblastic anemia to mitochondrial myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia 2. *Haematologica* 103, 2008–2015. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.182659>
- Roach, K.M., Bradding, P., 2020. Ca²⁺ signalling in fibroblasts and the therapeutic potential of KCa3.1 channel blockers in fibrotic diseases. *British Journal of Pharmacology* 177, 1003–1024. <https://doi.org/10.1111/bph.14939>
- Robier, C., Hoefler, G., Aubell, K., Hubmann, E., 2021. Acquired elliptocytosis as presenting sign of a myelodysplastic syndrome associated with deletion of chromosome 20 and mutations in TET2, DNMT3A, and U2AF1. *Ann Hematol* 100, 2111–2112. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-04368-w>
- Rossi, M., Meggendorfer, M., Zampini, M., Tettamanti, M., Riva, Emma, Travaglino, E., Bersanelli, M., Mandelli, S., Galbussera, A.A., Mosca, E., Saba, E., Chiereghin, C., Manes, N., Milanese, C., Ubezio, M., Morabito, L., Peano, C., Soldà, G., Asselta, R., Duga, S., Selmi, C., De Santis, M., Malik, K., Maggioni, G., Bicchieri, M.E., Campagna, A., Tentori, C.A., Russo, A., Civilini, E., Allavena, P., Piazza, R., Corrao, G., Sala, C., Termanini, A., Giordano, L., Detoma, P., Malabaila, A., Sala, L., Rosso, S., Zanetti, R., Saitta, C., Riva, Elena, Condorelli, G., Passamonti, F., Santoro, A., Sole, F., Platzbecker, U., Fenaux, P., Bolli, N., Castellani, G., Kern, W., Vassiliou, G., Haferlach, T., Lucca, U., Della Porta, M.G., 2021. Clinical relevance of clonal hematopoiesis in the oldest-old population. *Blood* blood.2021011320. <https://doi.org/10.1182/blood.2021011320>
- Russo, R., Andolfo, I., Manna, F., Gambale, A., Marra, R., Rosato, B.E., Caforio, P., Pinto, V., Pignataro, P., Radhakrishnan, K., Unal, S., Tomaiuolo, G., Forni, G.L., Iolascon, A., 2018. Multi-gene panel testing improves diagnosis and management of patients with hereditary anemias. *American Journal of Hematology* 93, 672–682. <https://doi.org/10.1002/ajh.25058>

- Russo, R., Marra, R., Rosato, B.E., Iolascon, A., Andolfo, I., 2020. Genetics and Genomics Approaches for Diagnosis and Research Into Hereditary Anemias. *Front Physiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.613559>
- Sadaf, A., Quinn, C.T., Korpik, J.B., Pfeiffer, A., Reynaud, M., Niss, O., Malik, P., Ware, R.E., Kalfa, T.A., McGann, P.T., 2020. Rapid and Automated Quantitation of Dense Red Blood Cells: A Robust Biomarker of Therapeutic Response to Early Initiation of Hydroxyurea in Young Children with Sickle Cell Anemia. *Blood* 136, 16–17. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-137070>
- Safeukui, I., Buffet, P.A., Deplaine, G., Perrot, S., Brousse, V., Sauvanet, A., Aussilhou, B., Dokmak, S., Couvelard, A., Cazals-Hatem, D., Mercereau-Puijalon, O., Milon, G., David, P.H., Mohandas, N., 2018. Sensing of red blood cells with decreased membrane deformability by the human spleen. *Blood Adv* 2, 2581–2587. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018024562>
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M., 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265, 687–695. <https://doi.org/10.1038/265687a0>
- Santos, B., Delgado, M., Ferreira, J., Germano, I., Miranda, A., Arez, A.P., Faustino, P., Brito, M., 2020. Co-Inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell disease in a cohort of Angolan pediatric patients. *Mol Biol Rep* 47, 5397–5402. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05628-8>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schrier, S., Rachmilewitz, E., Mohandas, N., 1989. Cellular and membrane properties of Alpha and Beta Thalassaemic erythrocytes are different: Implication for differences in clinical manifestations. *Blood* 74, 2194–202. <https://doi.org/10.1182/blood.V74.6.2194.bloodjournal7462194>
- Seiler, S., Arnold, A.J., Grove, R.I., Fifer, C.A., Keely, S.L., Stanton, H.C., 1987. Effects of anagrelide on platelet cAMP levels, cAMP-dependent protein kinase and thrombin-induced Ca⁺⁺ fluxes. *J Pharmacol Exp Ther* 243, 767–774.
- Seki, M., Arashiki, N., Takakuwa, Y., Nitta, K., Nakamura, F., 2020. Reduction in flippase activity contributes to surface presentation of phosphatidylserine in human senescent erythrocytes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24, 13991–14000. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16010>
- Seu, K.G., Trump, L.R., Emberesh, S., Lorsbach, R.B., Johnson, C., Meznarich, J., Underhill, H.R., Chou, S.T., Sakthivel, H., Nassar, N.N., Seu, K.J., Blanc, L., Zhang, W., Lutzko, C.M., Kalfa, T.A., 2020. VPS4A Mutations in Humans Cause Syndromic Congenital Dyserythropoietic Anemia due to Cytokinesis and Trafficking Defects. *The American Journal of Human Genetics* S0002929720303712. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.10.013>
- Shah, N., Bhatt, H., 2022. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Shmukler, B.E., Rivera, A., Bhargava, P., Nishimura, K., Hsu, A., Kim, E.H., Trudel, M., Rust, M.B., Hubner, C.A., Brugnara, C., Alper, S.L., 2019. Combined genetic disruption of K-Cl

- cotransporters and Gardos channel KCNN4 rescues erythrocyte dehydration in the SAD mouse model of sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis* 79, 102346. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2019.102346>
- Simionato, G., Hinkelmann, K., Chachanidze, R., Bianchi, P., Fermo, E., van Wijk, R., Leonetti, M., Wagner, C., Kaestner, L., Quint, S., 2021a. Red blood cell phenotyping from 3D confocal images using artificial neural networks. *PLoS Comput Biol* 17, e1008934. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008934>
- Simionato, G., van Wijk, R., Quint, S., Wagner, C., Bianchi, P., Kaestner, L., 2021b. Rare Anemias: Are Their Names Just Smoke and Mirrors? *Front Physiol* 12, 690604. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.690604>
- Singleton, B.K., Ahmed, M., Green, C.A., Heimpel, H., Woźniak, M.J., Ranjha, L., Seeney, F., Bomford, A., Mehta, P., Guest, A., Mushens, R., King, M.-J., 2018. CD44 as a Potential Screening Marker for Preliminary Differentiation Between Congenital Dyserythropoietic Anemia Type II and Hereditary Spherocytosis. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 94, 312–326. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21488>
- Smol, T., Frénois, F., Manouvrier-Hanu, S., Petit, F., Ghoumid, J., 2022. Performance of meta-predictors for the classification of MED13L missense variations, implication of raw parameters. *European Journal of Medical Genetics* 65, 104398. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2021.104398>
- Song, F., Feng, S., Shen, X., Du, M., Yin, H., Liu, R., Chen, X., 2020. Next-Generation Sequencing Revealed Disease-Causing Variants in Two Genes in a Patient With Combined Features of Spherocytosis and Antley-Bixler Syndrome With Genital Anomalies and Disordered Steroidogenesis. *Front Genet* 11, 976. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00976>
- Splicing and disease working group, Wai, H.A., Lord, J., Lyon, M., Gunning, A., Kelly, H., Cibin, P., Seaby, E.G., Spiers-Fitzgerald, K., Lye, J., Ellard, S., Thomas, N.S., Bunyan, D.J., Douglas, A.G.L., Baralle, D., 2020. Blood RNA analysis can increase clinical diagnostic rate and resolve variants of uncertain significance. *Genet Med* 22, 1005–1014. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0766-9>
- Starita, L.M., Ahituv, N., Dunham, M.J., Kitzman, J.O., Roth, F.P., Seelig, G., Shendure, J., Fowler, D.M., 2017. Variant Interpretation: Functional Assays to the Rescue. *The American Journal of Human Genetics* 101, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.07.014>
- Steinberg-Shemer, O., Tamary, H., 2020. Impact of Next-Generation Sequencing on the Diagnosis and Treatment of Congenital Anemias. *Mol Diagn Ther*. <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00478-3>
- Sudnitsyna, J., Skverchinskaya, E., Dobrylko, I., Nikitina, E., Gambaryan, S., Mindukshev, I., 2020. Microvesicle Formation Induced by Oxidative Stress in Human Erythrocytes. *Antioxidants (Basel)* 9, 929. <https://doi.org/10.3390/antiox9100929>
- Sullivan, K.E., 2020. The scary world of variants of uncertain significance (VUS): A hitchhiker's guide to interpretation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* S0091674920308885. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.06.011>
- Svetina, S., Švelc Kebe, T., Božič, B., 2019. A Model of Piezo1-Based Regulation of Red Blood Cell Volume. *Biophysical Journal* 116, 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.3130>
- Svidnicki, M.C.C.M., Zanetta, G.K., Congrains-Castillo, A., Costa, F.F., Saad, S.T.O., 2020. Targeted next-generation sequencing identified novel mutations associated with hereditary

- anemias in Brazil. *Ann Hematol* 99, 955–962. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-03986-8>
- Syeda, R., Xu, J., Dubin, A.E., Coste, B., Mathur, J., Huynh, T., Matzen, J., Lao, J., Tully, D.C., Engels, I.H., Petrassi, H.M., Schumacher, A.M., Montal, M., Bandell, M., Patapoutian, A., 2015. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07369>
- Synthesis and assembly of membrane skeletal proteins in mammalian red cell precursors, 1987. . *J Cell Biol* 105, 1417–1424.
- Taher, A.T., Weatherall, D.J., Cappellini, M.D., 2018. Thalassaemia. *The Lancet* 391, 155–167. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31822-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31822-6)
- Tanno, T., Miller, J.L., 2010. Iron Loading and Overloading due to Ineffective Erythropoiesis. *Advances in Hematology* 2010, e358283. <https://doi.org/10.1155/2010/358283>
- Thiagarajan, P., Parker, C.J., Prchal, J.T., 2021. How Do Red Blood Cells Die? *Frontiers in Physiology* 12.
- Thompson-Vest, N., Shimizu, Y., Hunne, B., Furness, J.B., 2006. The distribution of intermediate-conductance, calcium-activated, potassium (IK) channels in epithelial cells. *J Anat* 208, 219–229. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00515.x>
- Tseng, M.-H., Tsai, J.-D., Tsai, I.-J., Huang, S.-M., Huang, J.-L., Fan, W.-L., Lee, H.-J., Wu, T.-W., Lin, S.-H., 2019. Whole-exome sequencing detects mutations in pediatric patients with atypical hemolytic uremic syndrome in Taiwan. *Clin Chim Acta* 494, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.03.1623>
- Uribe, K.B., Chemello, K., Larrea-Sebal, A., Benito-Vicente, A., Galicia-Garcia, U., Bourane, S., Jaafar, A.K., Lambert, G., Martín, C., 2021. A Systematic Approach to Assess the Activity and Classification of PCSK9 Variants. *Int J Mol Sci* 22, 13602. <https://doi.org/10.3390/ijms222413602>
- Valenzuela-Palomo, A., Bueno-Martínez, E., Sanoguera-Miralles, L., Lorca, V., Fraile-Bethencourt, E., Esteban-Sánchez, A., Gómez-Barrero, S., Carvalho, S., Allen, J., García-Álvarez, A., Pérez-Segura, P., Dorling, L., Easton, D.F., Devilee, P., Vreeswijk, M.P., de la Hoya, M., Velasco, E.A., 2022. Splicing predictions, minigene analyses, and ACMG-AMP clinical classification of 42 germline PALB2 splice-site variants. *J Pathol* 256, 321–334. <https://doi.org/10.1002/path.5839>
- van de Stadt, S.I.W., Mooyer, P.A.W., Dijkstra, I.M.E., Dekker, C.J.M., Vats, D., Vera, M., Ruzhnikov, M.R.Z., van Haren, K., Tang, N., Koop, K., Willemsen, M.A., Hui, J., Vaz, F.M., Ebberink, M.S., Engelen, M., Kemp, S., Ferdinandusse, S., 2021. Biochemical Studies in Fibroblasts to Interpret Variants of Unknown Significance in the ABCD1 Gene. *Genes (Basel)* 12, 1930. <https://doi.org/10.3390/genes12121930>
- van Straaten, S., Biemond, B.J., Kerkhoffs, J.-L., Gitz-Francois, J., van Wijk, R., van Beers, E.J., 2018. Iron overload in patients with rare hereditary hemolytic anemia: Evidence-based suggestion on whom and how to screen. *American Journal of Hematology* 93, E374–E376. <https://doi.org/10.1002/ajh.25251>
- van Wijk, R., van Solinge, W.W., 2005. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* 106, 4034–4042. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1622>

- Vives-Corróns, J.-L., Krishnevskaya, E., Rodríguez, I.H., Ancochea, A., 2020. Characterization of hereditary red blood cell membranopathies using combined targeted next-generation sequencing and osmotic gradient ektacytometry. *Int J Hematol.* <https://doi.org/10.1007/s12185-020-03010-9>
- Wajcman, H., Riou, J., Yapó, A.P., 2002. Globin chain analysis by reversed phase high performance liquid chromatography: recent developments. *Hemoglobin* 26, 271–284. <https://doi.org/10.1081/hem-120015031>
- Weidmann, M., Faye, Ousmane, Faye, Oumar, Abd El Wahed, A., Patel, P., Batejat, C., Manugerra, J.C., Adjami, A., Niedrig, M., Hufert, F.T., Sall, A.A., 2018. Development of Mobile Laboratory for Viral Hemorrhagic Fever Detection in Africa. *J Infect Dis* 218, 1622–1630. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy362>
- Weile, J., Roth, F.P., 2018. Multiplexed assays of variant effects contribute to a growing genotype–phenotype atlas. *Hum Genet* 137, 665–678. <https://doi.org/10.1007/s00439-018-1916-x>
- Wheeler, D.A., Srinivasan, M., Egholm, M., Shen, Y., Chen, L., McGuire, A., He, W., Chen, Y.-J., Makhijani, V., Roth, G.T., Gomes, X., Tartaro, K., Niazi, F., Turcotte, C.L., Irzyk, G.P., Lupski, J.R., Chinault, C., Song, X., Liu, Y., Yuan, Y., Nazareth, L., Qin, X., Muzny, D.M., Margulies, M., Weinstock, G.M., Gibbs, R.A., Rothberg, J.M., 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452, 872–876. <https://doi.org/10.1038/nature06884>
- Williams, T.N., 2006. Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Curr Opin Microbiol* 9, 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.009>
- Wolfs, J.L., Wielders, S.J., Comfurius, P., Lindhout, T., Giddings, J.C., Zwaal, R.F., Bevers, E.M., 2006. Reversible inhibition of the platelet procoagulant response through manipulation of the Gardos channel. *Blood* 108, 2223–2228. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-009613>
- Wright, J.R., Mahaut-Smith, M.P., 2021. Why do platelets express K⁺ channels? *Platelets* 32, 872–879. <https://doi.org/10.1080/09537104.2021.1904135>
- Wrong, O., Bruce, L.J., Unwin, R.J., Toye, A.M., Tanner, M.J.A., 2002. Band 3 mutations, distal renal tubular acidosis, and Southeast Asian ovalocytosis. *Kidney International* 62, 10–19. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00417.x>
- Xu, T., Lizarralde-Iragorri, M.A., Roman, J., Ghasemi, R., Lefèvre, J.-P., Martincic, E., Brousse, V., Français, O., El Nemer, W., Le Pioufle, B., 2020. Characterization of red blood cell microcirculatory parameters using a bioimpedance microfluidic device. *Sci Rep* 10, 9869. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66693-4>
- Yao, Y., Qu, D., Jing, X., Jia, Y., Zhong, Q., Zhuo, L., Chen, X., Li, G., Tang, L., Zhu, Y., Zhang, X., Ji, Y., Li, Z., Tao, J., 2022. Molecular Mechanisms of Epileptic Encephalopathy Caused by KCNMA1 Loss-of-Function Mutations. *Front Pharmacol* 12, 775328. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.775328>
- Zaidi, A.U., Buck, S., Gadgeel, M., Herrera-Martinez, M., Mohan, A., Johnson, K., Bagla, S., Johnson, R.M., Ravindranath, Y., 2020. Clinical Diagnosis of Red Cell Membrane Disorders: Comparison of Osmotic Gradient Ektacytometry and Eosin Maleimide (EMA) Fluorescence Test for Red Cell Band 3 (AE1, SLC4A1) Content for Clinical Diagnosis. *Front. Physiol.* 11, 636. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00636>

- Zamora, E.A., Schaefer, C.A., 2022. Hereditary Spherocytosis, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Zanella-Cleon, I., Préhu, C., Joly, P., Riou, J., Becchi, M., Wajcman, H., Francina, A., 2009. Strategy for identification by mass spectrometry of a new human hemoglobin variant with two mutations in Cis in the beta-globin chain: Hb S-Clichy [$\beta 6(A3)Glu \rightarrow Val$; $\beta 8(A5)Lys \rightarrow Thr$]. *Hemoglobin* 33, 177–187. <https://doi.org/10.1080/03630260903061184>
- Zaninoni, A., Fermo, E., Vercellati, C., Consonni, D., Marcello, A.P., Zanella, A., Cortelezzi, A., Barcellini, W., Bianchi, P., 2018a. Use of Laser Assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LoRRca MaxSis) in the Diagnosis of RBC Membrane Disorders, Enzyme Defects, and Congenital Dyserythropoietic Anemias: A Monocentric Study on 202 Patients. *Front. Physiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00451>
- Zaninoni, A., Fermo, E., Vercellati, C., Consonni, D., Marcello, A.P., Zanella, A., Cortelezzi, A., Barcellini, W., Bianchi, P., 2018b. Use of Laser Assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LoRRca MaxSis) in the Diagnosis of RBC Membrane Disorders, Enzyme Defects, and Congenital Dyserythropoietic Anemias: A Monocentric Study on 202 Patients. *Front. Physiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00451>
- Zarkowsky, H.S., Mohandas, N., Speaker, C.B., Shohet, S.B., 1975. A Congenital Haemolytic Anaemia with Thermal Sensitivity of the Erythrocyte Membrane. *British Journal of Haematology* 29, 537–543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1975.tb02740.x>
- Zhao, Q., Zhou, H., Li, X., Xiao, B., 2019. The mechanosensitive Piezo1 channel: a three-bladed propeller-like structure and a lever-like mechanogating mechanism. *The FEBS Journal* 286, 2461–2470. <https://doi.org/10.1111/febs.14711>
- Zhou, Y., Zhong, C., Yang, Q., Zhang, G., Yang, H., Li, Q., Wang, M., 2021. Novel SARS2 variants identified in a Chinese girl with HUPRA syndrome. *Mol. Genet. Genomic Med.* 9. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1650>

Liste des sites web cités

<https://gnomad.broadinstitute.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>

<http://www.omim.org>,

<http://www.hgmd.org>

<https://rrmechatronics.com/product/rbc-2/lorrca/>

<http://drrajivdesaimd.com/2015/08/24/pulse-oximetry/>

http://ksumsc.com/download_center/

https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-07/pnds_spherocytose_hereditaire_et_autres_anemies_hemol_par_anomalie_mb_gr.pdf